



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Comparación de eficiencia en los métodos de fraccionamiento para microalgas y/o
cianobacterias a través de la evaluación de actividad antioxidante.

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de
Bioquímica Farmacéutica.

Autora:

Tania Verónica Benenaula Duchi

CI: 0106383318

tani_benenaula@hotmail.es

Director:

Dr. Fabián León Tamariz Ph.D.

CI: 0102311610

Cuenca, Ecuador

21 de abril de 2021

Resumen:

Debido al interés en la búsqueda de antioxidantes de fuentes de origen natural, las microalgas y cianobacterias han captado la atención por su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos bajo condiciones extremas de supervivencia. Por lo que el estudio de la biodiversidad y las aplicaciones biotecnológicas que confieren este grupo de microorganismos es de gran importancia para la ciencia.

En la presente investigación, se detalla la revisión de dos métodos de extracción de componentes bioactivos para microalgas y cianobacterias obtenidos a partir de especies cultivadas en el Laboratorio de Investigación de Microalgas del Grupo VLIR de “Plantas Medicinales” del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

En efecto, se comparó la micronización y el ultrasonido, técnicas que promueven la fragmentación celular y la liberación del material intracelular. A su vez, se determinó la capacidad antioxidante del contenido bioactivo liberado aplicando la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para cada extracto metanólico de las tres especies analizadas: *Tamariz #6*, *Tamariz #11* y *Flores #1*.

La técnica de DPPH valoró la decoloración del radical (DPPH) por acción de un antioxidante (extracto metanólico). Esta evaluación se expresó a través del cálculo del AAEAC (miligramos de ácido ascórbico equivalente a 100 gramos de droga seca) alcanzando valores entre 14,53 mg/g – 20,08 mg/g para extractos tratados por el método de Ultrasonido y valores entre 66,20 mg/g – 73.17 mg/g para los del método de Micronización.

El resultado de este estudio determinó que la técnica más eficiente para extracción de componentes bioactivos fue por el método de micronización debido a que reveló mayor actividad antioxidante por la gran cantidad de componentes bioactivos presentes en los extractos.

Palabras claves: Microalgas. Cianobacterias. Micronización. Actividad Antioxidante. DPPH.

Abstract

Due to the interest in the search for antioxidants from natural sources, microalgae and cyanobacteria have attracted attention for their ability to synthesize bioactive compounds under extreme conditions of survival. So, the study of biodiversity and biotechnological applications conferred by this group of microorganisms is of great importance for science.

In this research, the review of two methods of extraction of bioactive components for microalgae and cyanobacteria obtained from species cultivated in the Microalgae Research Laboratory of the VLIR Group of "Medicinal Plants" of the Department of Biosciences of the University of Basin.

Indeed, micritization and ultrasound were compared, techniques that promote cellular fragmentation and the release of intracellular material. In turn, the antioxidant capacity of the released bioactive content was determined by applying the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) technique for each methanolic extract of the three analyzed species: Tamariz # 6, Tamariz # 11 and Flores # 1.

The DPPH technique assessed radical discoloration (DPPH) by the action of an antioxidant (methanolic extract). This evaluation was expressed through the calculation of the AAEC (milligrams of ascorbic acid equivalent to 100 grams of dry drug) reaching values between 14.53 mg / g - 20.08 mg / g for extracts treated by the Ultrasound method and values between 66.20 mg / g - 73.17 mg / g for those of the Micronization method.

The result of this study determined that the most efficient technique for extraction of bioactive components was by the micronization method because it revealed higher antioxidant activity due to the large amount of bioactive components present in the extracts.

Keywords: Microalgae. Cyanobacteria. Micronization. Antioxidant Activity. DPPH.



ÍNDICE DEL TRABAJO

AGRADECIMIENTO	11
INTRODUCCIÓN	12
HIPÓTESIS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
CAPÍTULO I	14
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1 GENERALIDADES	14
1.2 CARACTERÍSTICAS DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS	15
1.2.1 Microalgas	15
1.2.2 Cianobacterias	16
1.2.3 Nutrición de microalgas y cianobacterias	17
1.2.4 Reproducción	18
1.2.5 Importancia	18
1.2.6 Estudios en el Ecuador	20
1.3 CULTIVO DE MICROALGAS	20
1.3.1 Tipos de medio de cultivo	21
1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	22
1.4.1 Micronización	23
1.4.2 Ultrasonido	24
1.5 ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	25
1.5.1 Actividad antioxidante	25
1.5.1.1 Radicales libres	25
1.5.1.2 Metabolitos relacionados con actividad antioxidante	26
1.5.2 Determinación de la actividad antioxidante	27
1.5.2.1 Técnica de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	27
1.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC)	28
1.5.3.1 Fundamento	28
1.5.3.2 Factor de retención (Rf)	30
CAPÍTULO II	31



2. METODOLOGÍA.....	31
2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL.....	31
2.2 ETAPA DE CULTIVO	31
2.2.1 Técnica de Cultivo	31
2.2.2 Centrifugación (cosecha de biomasa).....	33
2.3 LIOFILIZACIÓN	33
2.4 ETAPA DE EXTRACCIÓN	34
2.4.1 Maceración.....	34
2.4.2 Ultrasonido.....	35
2.4.3 Micronización.....	35
2.4.4 Filtración.....	37
2.5. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	37
2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	39
2.6.1 Técnica de DPPH (captación de radicales libres).	39
2.6.1.1 Preparación de la solución de DPPH.....	39
2.6.1.2 Elaboración de la curva de calibración	40
2.6.1.3 Preparación de los extractos	41
2.6.1.4 Expresión de los resultados	41
2.6.2 Cromatografía de capa fina (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY-TLC).....	42
2.6.2.1 Preparación de placas para TLC.....	42
2.6.2.2 Aplicación de la muestra	43
2.6.2.3 Elución sobre placa.....	43
2.6.2.4 Revelado postcromatográfico	44
CAPITULO III	45
3. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1 RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA.....	45
3.2 RESULTADOS DE MICROALGAS TRATADAS POR MICRONIZACIÓN	47
3.3 RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	49
3.3.1 Validación de curvas de calibración de ácido ascórbico empleadas para la determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazilo)	49
3.3.2 Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante expresados en AAEAC.....	51
3.3.2.1 Resultados de AAEAC para extractos obtenidos por ultrasonido	51
3.3.2.2 Resultados de AAEAC para extractos obtenidos por micronización	53



3.4 RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)	57
CAPITULO IV	61
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
5. BIBLIOGRAFÍA:	62
6. ANEXOS	67
ANEXO 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO (MEDIOS DE CULTIVO)	67
Anexo 1.1: Solución de trabajo BG-11 (Blue Green-11).....	67
Anexo 1.2: Solución de trabajo WC	67
Anexo 1.3: Solución de trabajo f/2	68
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO POR EL MÉTODO DE DPPH	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Características de microalgas y cianobacterias.	16
Figura 1.2: Proceso de fotosíntesis de microalgas y cianobacterias	18
Figura 1.3: Compuestos bioactivos de microalgas y cianobacterias.....	19
Figura 1.4: Cultivo de microalgas y cianobacterias.	21
Figura 1.5: Extracción y procesamiento de microalgas y cianobacterias.	25
Figura 1.6: Ilustración de la cromatografía en capa fina.	29
Figura 2.1: Montaje del cultivo de las microalgas.	32
Figura 2.2: a) Muestra madre de las microalgas en estudio. b) Proceso de siembra de microalgas.	32
Figura 2.3: Equipo de liofilización Freezone Labconco (Kansas City, Missouri).	34
Figura 2.5: Equipo Bead-Beater para micronización (Biospec Products, China).....	36
Figura 2.6: a) Equipo de rotavapor Laborota 4000 efficient Heidolph (Alemania) b) Balón con residuo seco final.	38
Figura 2.7: Aplicación de corriente de nitrógeno gaseoso a muestras de redisolución.	38
Figura 2.8: Extractos de microalgas y cianobacterias liofilizadas.	39
Figura 2.9: Coloración violeta de solución de metanol y reactivo de DPPH.	40
Figura 2.10: a) Cámara de cromatografía de capa fina (TLC). b) Placa sílica gel con bandas cromatográficas de microalgas y cianobacterias.....	43
Figura 3.1: Fotos TAMARIZ #11 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).....	47
Figura 3.2: Fotos TAMARIZ #6 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).....	48
Figura 3.3: Fotos FLORES #1 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).....	48
Figura 3.4: Curva de calibración del ácido ascórbico mediante la técnica de DPPH.....	50
Figura 3.5: Cromatograma en espectro visible para Antioxidantes, revelador DPPH en los extractos metanólicos de microalgas y cianobacterias codificadas de la siguiente forma: FLORES 1 (MAAL24), TAMARIZ 11 (MAAL29) Y TAMARIZ 6 (MAAL33). A la derecha se encuentra el corrimiento de los extractos obtenidos por Micronización y a la izquierda se encuentra los que fueron obtenidos por Ultrasonido.	58
Figura 3.6: Cromatograma en espectro visible para terpenoides, revelador Anisaldehído-Ácido Sulfúrico en los extractos metanólicos de microalgas y cianobacterias codificadas de la siguiente manera: FLORES 1 (MAAL24), TAMARIZ 11 (MAAL29) Y TAMARIZ 6 (MAAL33). A la derecha se encuentra el corrimiento de los extractos obtenidos por Micronización y a la izquierda se encuentra los que fueron obtenidos por Ultrasonido.....	59
Figura 6.1: Curva de calibración #1.	69



Figura 6.2: Curva de calibración #2.	70
Figura 6.4: Curva de calibración #4.	72
Figura 6.5: Curva de calibración #5.	73
Figura 6.6: Curva de calibración #6.	74



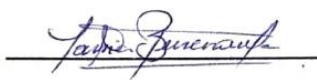
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Estrategias de adaptación de las microalgas y cianobacterias, y compuestos activos generados como defensa en situaciones de estrés.	26
Tabla 2.1. Características de medios de cultivo en microalgas y cianobacteria, y tiempo de cambio/cosecha.	33
Tabla 2.2: Concentraciones de las diluciones de Ácido ascórbico para la curva de calibración.	40
Tabla 2.3: Identificación y separación de metabolitos activos en cromatografía de capa fina.	44
Tabla 3.1: Resultados de rendimiento de biomasa extraída por Micronización.	45
Tabla 3.2: Resultados de rendimiento de biomasa extraída por Ultrasonido.	45
Tabla 3.3: Absorbancias de curva de calibración del ácido ascórbico por técnica de DPPH.	50
Tabla 3.4: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #6.	51
Tabla 3.5: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #11.	52
Tabla 3.6: Resultados de absorbancias y AAEAC de FLORES #1.	52
Tabla 3.7: Resultados de AAEAC absorbancias y de TAMARIZ #6.	53
Tabla 3.8: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #11.	53
Tabla 3.9: Resultados de absorbancias y AAEAC de FLORES #1.	54
Tabla 3.10: Resultados de comparación de los promedios de actividad antioxidante de los diferentes extractos mediante Ultrasonido y Micronización.	54
Tabla 3.11: Resultados de prueba T student de la actividad antioxidante de las microalgas y cianobacterias.	56
Tabla 6.1: Componentes del medio BG-11 para Chlorella (Tamariz #6 y Flore #1)	67
Tabla 6.2: Componentes del medio WC para cianobacterias (Tamariz #11).	68
Tabla 6.3: Componentes del medio f/2 para microalga naranja.	68
Tabla 6.4: Curva de calibración #1.	69
Tabla 6.5: Curva de calibración #2.	70
Tabla 6.6: Curva de calibración #3.	71
Tabla 6.7: Curva de calibración #4.	72
Tabla 6.8: Curva de calibración #5.	73
Tabla 6.9: Curva de calibración #6.	74

Cláusula de Propiedad Intelectual

Tania Verónica Benenaula Duchi, autor/a del trabajo de titulación "Comparación de eficiencia en los métodos de fraccionamiento para microalgas y/o cianobacterias a través de la evaluación de actividad antioxidante", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 21 de abril de 2021.



Tania Verónica Benenaula Duchi

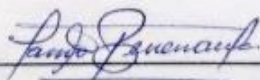
C.I.: 0106383318

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Tania Verónica Benenaula Duchi en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"Comparación de eficiencia en los métodos de fraccionamiento para microalgas y/o cianobacterias a través de la evaluación de actividad antioxidante"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de abril de 2021.



Tania Verónica Benenaula Duchi

C.I: 0106383318



AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud a Dios por permitirme vivir este anhelado sueño en mi vida, mis sinceros agradecimientos a todos mis profesores por su entrega y dedicación en la enseñanza de la Bioquímica y Farmacia.

Correspondo de manera infinita a mis padres que, con su paciencia y confianza, me impulsaron a no decaer nunca durante todo este proceso. A mis hermanas Daniela por su apoyo total y Jessica por darme una voz de aliento siempre.

Finalmente, de manera especial mi agradecimiento a Guillermo por su lealtad, amor y sus consejos de vida.

Tania

INTRODUCCIÓN

Las microalgas y cianobacterias han sido aprovechadas desde la antigüedad por los seres humanos en la medicina, industria, alimentación y agricultura. Esto se debe a que presentan mayor eficiencia fotosintética en referencia a la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas superiores, lo que les confiere un alto potencial bioactivo. Estos microorganismos desempeñan un papel esencial en el mantenimiento y funcionamiento global de los ecosistemas, así como, en las propiedades que benefician a la industria biotecnológica, alimentaria, cosmetológica y farmacéutica (Doucha & Livansky, 2005).

Las investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado que variedad de patologías, entre ellas procesos inflamatorios, neurodegenerativos e incluso el envejecimiento están vinculadas con el estrés oxidativo que sufren las células debido a un desbalance entre los mecanismos antioxidantes y los radicales libres. Por ello, el potencial farmacológico de las microalgas y cianobacterias se manifiesta en la producción de sustancias de interés bioquímico como proteínas, vitaminas, pigmentos, ácidos grasos poliinsaturados, etc. Además, se ha revelado la presencia de compuestos polifenólicos en estos microorganismos que poseen propiedades antioxidantes que neutralizan radicales libres e inhiben la peroxidación lipídica evitando de esta forma el estrés oxidativo celular (Avello & Suwalsky, 2006; Goiris et al., 2012).

Por lo antes expuesto, es de gran interés el conocimiento de la capacidad antioxidante de las microalgas y cianobacterias, así como de los procesos de extracción del potencial bioactivo.

En este estudio, se presenta la revisión de dos métodos de extracción (Micronización y Ultrasonido) de componentes bioactivos provenientes de microalgas y cianobacterias. Estas técnicas consisten en la exposición de las microalgas a un método de ruptura celular; las cuales crean fricción molecular y debilitan la pared celular liberando el contenido microalgal; a diferencia de los tejidos

vegetales, las microalgas y cianobacterias presentan cierto grado de dificultad en la extracción completa de sus compuestos, debido al tamaño celular relativamente pequeño (2-200 μm), por lo que es importante la selección idónea del método más eficiente de extracción que refleje mayor rendimiento (Rodríguez, 2017).

Finalmente, a través de la aplicación de la técnica de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de captación de radicales libres, se verificó la acción antioxidante de las microalgas y cianobacterias; y, se validó el método de extracción que presentó mejor rendimiento.

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas para el desarrollo del estudio fueron:

- Los extractos metanólicos de microalgas y/o cianobacterias estudiadas poseen actividad antioxidante.
- La micronización es una técnica más efectiva que el ultrasonido para la extracción de principios activos de microalgas y/o cianobacterias.

Objetivo general

- Comparar las técnicas de fraccionamiento celular (micronización y ultrasonido) sobre microalgas y cianobacterias aisladas en cuerpos de agua poco profundos de la región del Cajas y cultivadas en laboratorio.

Objetivos específicos

- Someter las 5 especies de microalgas y cianobacterias aisladas a métodos estandarizados de cultivo: medios WC y BG-11.
- Obtener extractos metanólicos de las microalgas y/o cianobacterias cultivadas.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos mediante la técnica de DPPH como criterio de diferenciación entre las técnicas de extracción: Micronización y Ultrasonido.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES

Las microalgas al igual que las cianobacterias son microorganismos que tienen una amplia distribución geográfica; y, aunque la mayoría se desarrollan en agua dulce también se encuentran en cuerpos de agua salada, residuales o incluso en el suelo, bajo condiciones extremas para lo cual desarrollan características extraordinarias de adaptación (Guamán & González, Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador, 2016).

El Ecuador está calificado como un país con una gran biodiversidad en microalgas y cianobacterias, sin embargo, estos microorganismos han sido escasamente estudiados; por lo que, se necesitan profundizar en la investigación de estas especies que permitan caracterizarlas y aprovechar sus beneficios farmacológicos.

Según lo antes mencionado, explorar fuentes alternativas es un gran reto para la humanidad. Para ello, se deben realizar estudios permanentes para mejorar la producción de materia prima de microalgas y cianobacterias; y, por ende, optimizar resultados que generen menor tiempo en su producción y conduzcan a mejores rendimientos (Samaniego, 2019).

La extracción del material potencialmente bioactivo de microalgas y cianobacterias se obtiene del interior de la célula. Dicha extracción requiere de ruptura celular y se puede lograr usando métodos mecánicos como homogeneizadores y la técnica del ultrasonido a través de ondas acústicas. Estos métodos presentan ventajas como menor tiempo de extracción, uso de solventes no tóxicos y la capacidad de trabajar con material biológico microscópico. La ruptura de la microestructura de estos microorganismos requiere de un método efectivo que permita la disrupción total para la liberación del contenido potencialmente activo, todo ello bajo un control óptimo de temperatura para evitar daños en la materia prima (Rodríguez, 2017).

De tal manera, esta investigación pretende conocer la eficiencia de dos técnicas de extracción que revelen mayor actividad antioxidante de microalgas y cianobacterias recolectadas en cuerpos de agua del parque Nacional El Cajas-Azuay. La importancia del estudio radica en el alto grado de conservación que existe en esta zona, debido a condiciones geográficas, climatológicas y fisicoquímicas que podrían favorecer la producción de sustratos para el crecimiento de estas especies y por lo tanto para la síntesis de compuestos activos farmacológicos.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS

Las microalgas y cianobacterias representan una de las formas de vida más antigua que se conoce, se las consideran responsables de la producción del 50% del oxígeno y del 50% de la fijación del carbono en el planeta. En general, son altamente eficientes en la fijación del CO₂ y en la utilización de la energía solar para producir biomasa, representando una eficiencia hasta cuatro veces superior a la de las plantas (Sevilla, 2014).

1.2.1 Microalgas

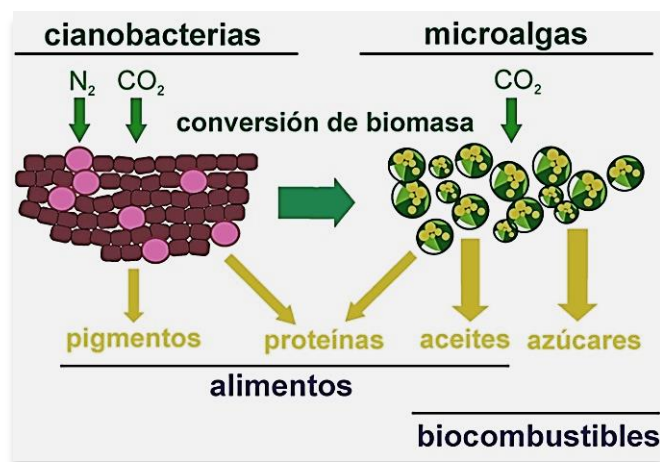
Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, eucariotas, que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica; poseen una pared celular polisacárida con organelas citoplasmáticas rodeados de una membrana definida, cloroplastos y un núcleo con material genético de almacenamiento. La biomasa de las microalgas está constituida principalmente por clorofila, proteínas, carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%); porcentajes que varían de acuerdo a las especies y condiciones de cultivo. El desarrollo nutricional es a base de especies nitrogenadas como nitrato, amonio o aminoácidos (Sevilla, 2014).

1.2.2 Cianobacterias

La palabra cianobacteria deriva del prefijo griego “*cyanus*” que significa azul, es por ello que se las conoce como algas verde-azules por la coloración verde oliva azulado que las identifica; sin embargo, se pueden encontrar de otras tonalidades. Las cianobacterias se diferencian de las microalgas por su estructura simple que las clasifica como procariotas semejantes a las bacterias, no poseen núcleo definido, pero son capaces de moverse a través del sistema por deslizamiento semejante a las bacterias; se incluyen dentro de la categoría de las microalgas debido a que llevan a cabo la fotosíntesis con producción de oxígeno y particularmente pueden fijar N_2 atmosférico (Sevilla, 2014).

En la periferia poseen una fina estructura de cloroplastos (tilacoides), presencia de flagelos y el núcleo que contienen el material genético de la célula rodeado de una doble membrana. Además, concentran metabolitos de reserva como almidones y glicerol en el nucleolo de la célula (Guamán & González, Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador, 2016).

Figura 1.1: Características de microalgas y cianobacterias.



Fuente y elaboración: (INBIOTEC, 2021).

1.2.3 Nutrición de microalgas y cianobacterias

La mayoría de este grupo de microorganismos es foto-autótrofo por lo que principalmente dependen de la luz solar como fuente de energía para procesos metabólicos y la fijación de CO_2 como fuente de producción de carbohidratos y energía en forma de Adenosin Trifosfato (ATP) (Guamán & González, Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador, 2016).

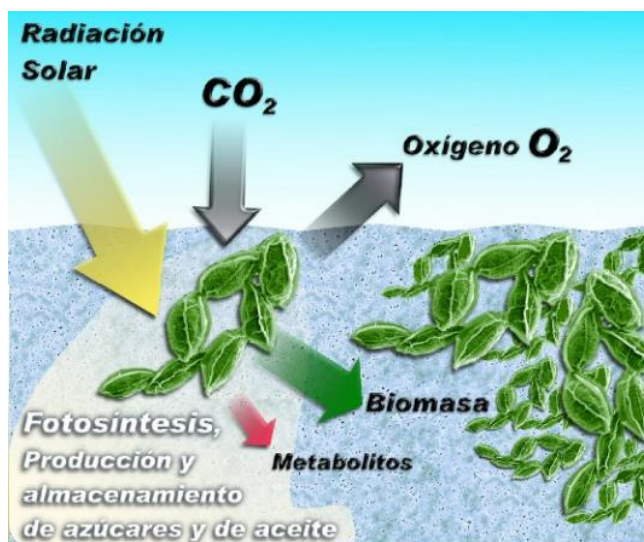
Los compuestos reducidos de carbono, se usan como estructura base para la incorporación de elementos importantes como el nitrógeno, fósforo y hierro; generando aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y carbohidratos que se ensamblan para originar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos que constituyen la biomasa de estos microorganismos (Price, Badger, Woodger, & Long, 2008).

De acuerdo a su capacidad metabólica se clasifican en:

- Heterotróficas obligadas
- Fototróficas obligadas
- Mixotróficas facultativos
- Mixotróficas obligadas

Las microalgas y cianobacterias además de necesitar luz, requieren de factores de crecimientos orgánicos, incluyendo algunas vitaminas como la cobalamina, tiamina y biotina, entre otros (Doucha & Livansky, 2005).

Figura 1.2: Proceso de fotosíntesis de microalgas y cianobacterias



Fuente y elaboración: (Gonzalez, ¿Qué son las microalgas? Interés y uso, 2015).

1.2.4 Reproducción

A pesar de las diferencias en estructura, ambos tipos de microorganismos se comportan fisiológicamente de manera similar. Generalmente se da la reproducción por división binaria, producción de esporas (R. asexual) y por unión de gametos (R. sexual) (Barsanti & Gualtieri, *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, 2006).

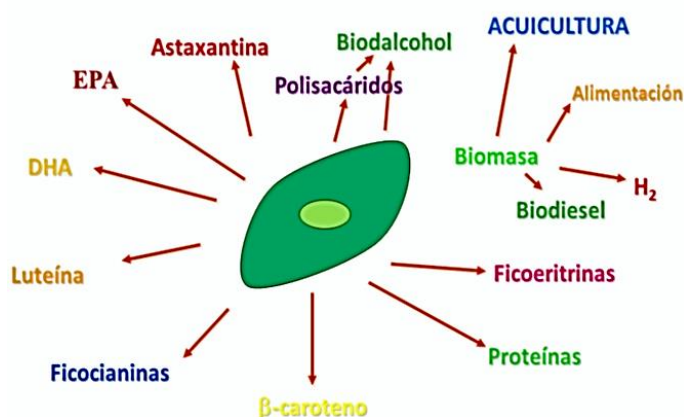
La duración del ciclo celular desde el crecimiento y división de la célula madre a las células hijas depende del tamaño celular; teniendo el ciclo más corto de dos horas en la cianobacteria *Synechococcus* mientras que en la microalga *Chlorella* aproximadamente seis horas, es así que, existen especies capaces de cuadruplicar su biomasa en un solo día (Lee, 2008).

1.2.5 Importancia

La importancia de estos microorganismos fotosintéticos radica en su rol dentro del mantenimiento de la vida en la Tierra, ya que transforman compuestos inorgánicos

en orgánicos y oxígeno para dar soporte al resto de seres vivos. Esta característica debe ser aprovechada mediante la extracción de sus componentes y producción masiva orientada a la obtención a gran escala. Además, al trabajar con cultivos de microalgas y cianobacterias de una determinada especie con la aplicación de una técnica eficiente de extracción, se puede obtener biomasa celular de una composición similar y de mayor rendimiento, garantizando la reproducción de los resultados (Blas, Ortiz, Pineda, Hernandez, & Cano, 2011).

Figura 1.3: Compuestos bioactivos de microalgas y cianobacterias.



Fuente y elaboración: (Gonzalez, ¿Qué son las microalgas? Interés y uso, 2015).

Es importante resaltar que ciertas microalgas y cianobacterias están prescritas para el consumo humano, pero también existen especies de cierto grado de toxicidad que son aprovechadas con otros fines, como por ejemplo, la producción de biodiesel y la biorremediación de aguas residuales (Sevilla, 2014).

Es por ello que, en los últimos años se han convertido en importante fuente de investigación de nuevas especies de microalgas, por citar algunos ejemplos tenemos, la especie microalga Rhodophyta *Porphyridium cruentum* ha demostrado su poder antioxidante por la producción de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA) de la serie omega-3 y el ácido araquidónico (AA) de la serie omega-6, pigmentos como la ficoeritrina y enzimas como la super óxido

dismutasa, colaborando en el tratamiento de las células cancerosas (Pulz & Gross, 2004).

Del mismo modo, el género *Spirulina* presenta potencial antioxidante debido al alto contenido de compuestos carotenoides, ácidos grasos y ficobiliproteínas encontrados en su estructura. Las ficobiliproteínas son pigmentos fotosintéticos, de las cuales la ficocianina constituye más del 50%, por ello la abundancia de antioxidantes presentes en las cianobacterias evita procesos biológicos de envejecimiento y degenerativos (Básaca-Loya, Valdez, Enríquez-Guevara, Gutiérrez-Millán, & Burboa, 2009; Pulz & Gross, 2004).

1.2.6 Estudios en el Ecuador

Los estudios efectuados en Ecuador sobre estos microorganismos se enfocan con mayor prioridad en el cultivo en grandes masas y en la producción de biodiesel para lo que se han realizado varios análisis en laboratorios de biotecnología. Esto se debe al agotamiento acelerado de las reservas de combustibles fósiles que han impulsado su investigación y desarrollo de tecnologías energéticas amigables con el ambiente (Gavilanes, 2013).

El enfoque también se da principalmente en la conservación del medioambiente ya que la contaminación global crece de forma acelerada y para ello se ha implementado filtros biológicos a base de microalgas que optimicen la purificación del aire con el objetivo de reducir el dióxido de carbono de una manera altamente eficiente en el aire de la capital del Ecuador. Esta propuesta ecuatoriana ha ganado reconocimiento a nivel mundial (Samaniego, 2019).

1.3 CULTIVO DE MICROALGAS

El cultivo de las microalgas y cianobacterias abarca varios aspectos que van desde la recolección de especies, microcultivo en laboratorio con el objetivo de amplificar

su población, la investigación de las condiciones óptimas de cultivo y la producción industrial (Guamán & González, Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador, 2016).

Al igual que otros organismos vivos, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de las microalgas y cianobacterias. Por tanto, para obtener un cultivo de microalgas en crecimiento activo, es necesario optimizar las condiciones fisicoquímicas (Luz, temperatura, pH, aireación, agitación o la velocidad de la dilución); y, seleccionar el medio de cultivo ideal para cada especie de microalga o cianobacteria para obtener una productividad eficiente de biomasa (Sevilla, 2014).

Figura 1.4: Cultivo de microalgas y cianobacterias.



Fuente y elaboración: (Urbano, 2018).

1.3.1 Tipos de medio de cultivo

El medio de cultivo es una disolución acuosa que permite el desarrollo continuo de las microalgas y cianobacterias, es importante elegir el medio específico para cada género.

- **Medio BG-11**

El medio BG-11 se encuentra triplemente suplementado con NaNO_3 y se ajusta a pH 7-8. Usado como medio específico para cianobacterias debido a las altas concentraciones de nitrato y fósforo, potenciando el crecimiento de cianobacterias fijadoras (Sevilla, 2014).

- **Medio WC O de Wright**

Se usa para cultivar criptofitas. El medio WC es ligeramente alcalino, contiene bicarbonato de sodio, silicato y sulfato de magnesio y una baja concentración de fosfato, contiene además elementos traza de metales y vitaminas, se usa para cultivar especies tolerantes de pH neutro (7-8) (Chepurnova, 2000).

- **Medio f/2 de Guillard**

Es un medio de cultivo de enriquecimiento marino, contiene nutrientes principales en los que figura fósforo, silicio, nitratos. Además, contiene traza de metales y vitaminas. Este medio es utilizado específicamente para especies marinas (Biospec, 2020; Sevilla 2014).

1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Previo a la extracción de los componentes celulares de microalgas y cianobacterias se somete a la biomasa a un proceso de secado y de maceración, detallados a continuación:

Secado de biomasa: este proceso permite eliminar la mayor parte de la humedad de la biomasa. El más común es la liofilización, que se basa en la sublimación del hielo, realizado al vacío y a baja temperatura. Se produce el paso del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca agua en su estado líquido. El

producto final es una masa seca, de aproximadamente el mismo tamaño que la masa original, mejorando su estabilidad sin alterar la composición cualitativa o cuantitativa. (GIDOLQUIM, 2014).

Maceración: consiste en humedecer la biomasa con cantidad suficiente del solvente hidrofílico (metanol) hasta cubrimiento total, para que luego de un tiempo determinado a temperatura menor a 20°C de temperatura la mayoría de sustancias intracelulares (dependiendo del solvente) lleguen a un equilibrio a ambos lados de la membrana. La maceración produce dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido o el propio extracto.

Aplicación de métodos de extracción de biomasa:

Posteriormente a la maceración se aplica el rompimiento celular de microalgas y cianobacterias. Al final de este proceso se obtiene un producto denominado extracto que representa una mezcla compleja de varios compuestos bioactivos, los cuales presentaran un potencial farmacológico a nivel de la salud, industrial, etc.

La dificultad de trabajar con microalgas y cianobacterias se presenta en aplicar un método de extracción tan eficiente que provoque la liberación total de los componentes celulares. Para el presente estudio se eligió dos técnicas de lisis celular: Ultrasonido y Micronización (Guamán & González, Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador, 2016).

1.4.1 Micronización

La Micronización es una técnica mecánica que usa un homogeneizador con cuentas de vidrio (Bead Beater) para la disrupción de células y tejidos. La ruptura ocurre por la agitación vigorosa de las perlas de vidrio con las células. (Biospec, BeadBeater: instrucciones de operación, 2020).

La aplicación del método *Bead Beater* logra el 90% a 95% del rompimiento celular en un tiempo aproximado de 2 a 5 minutos. La micronización involucra la

homogenización de una muestra con cuentas de vidrio de 0.1 mm a 0.5 mm de diámetro en una cámara de policarbonato en ciclos de operación y reposo, tomando en cuenta un sistema de enfriamiento para aislar compuestos biológicos del interior de una célula (Biospec, BeadBeater: instrucciones de operación, 2020).

La ventaja de este método radica en su aplicación para todo tipo de material celular, en comparación con otros métodos de ruptura celular mecánica ya facilita la fragmentación de la muestra y no libera aerosoles potencialmente dañinos en el proceso, por lo que se considera el método de elección para tratar a células difíciles de alterar como cianobacterias, esporas y microalgas debido al particular tamaño de estos microorganismos (Biospec, BeadBeater: instrucciones de operación, 2020).

1.4.2 Ultrasonido

El Ultrasonido se usa para mejorar el rendimiento y la selectividad de extracción de compuestos bioactivos. Es un método de aplicación de energía del sonido para agitar las partículas en una muestra para la extracción de compuestos de microalgas y cianobacterias. Se utiliza el equipo de ultrasonido de alta frecuencia (>20 kHz) por lo que también se conoce como ultrasonificación (Bermúdez, 2012).

El efecto del ultrasonido se debe a la compresión del efecto de las ondas sonoras que migran a través del medio y se transforman en energía mecánica, mismas que se introducen al interior de las células de microalgas y cianobacterias. Esta acción permite la ruptura de las interacciones intermoleculares de la membrana y favorece la desintegración celular. La ventaja de este método es que permite operar de forma continua sin provocar desnaturalización de los componentes bioactivos. (Azhmir, Zaidul, Sharif, Mohamed, & Sahena, 2013; Bermudez, 2012; Hielscher, 2019).

Figura 1.5: Extracción y procesamiento de microalgas y cianobacterias.



Fuente y elaboración: (González, 2015).

1.5 ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

1.5.1 Actividad antioxidante

La importancia de los antioxidantes para inhibir o retardar la oxidación biomolecular, ha conducido a la identificación y caracterización de compuestos naturales que presenten propiedades antioxidantes. Los antioxidantes son componentes químicos que interactúan con los radicales libres y los neutralizan. Los humanos producen antioxidantes endógenos, no obstante, dependen también de fuentes externas (exógenas), los cuales se adquieren a través de la dieta principalmente (Cano et al., 2012).

1.5.1.1 Radicales libres

Un radical libre es una molécula presente en el organismo que se caracteriza por su inestabilidad debido a que posee un electrón no apareado en su último orbita. Resultan del producto de reacciones del metabolismo normal celular o por la exposición a agentes contaminantes del medio ambiente (radiación y toxinas); son eliminados continuamente por las defensas antioxidantes propias del organismo, pero cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger al organismo del efecto dañino de los radicales libres pueden conducir al estrés oxidativo celular y la

peroxidación lipídica, lo que se vincula a una diversidad de patologías de tipo cancerígenas. (Pedraza Chaverri & Cardenas, 2018).

1.5.1.2 Metabolitos relacionados con actividad antioxidante

Actualmente, la investigación de los metabolitos presentes en las microalgas y cianobacterias se enfoca principalmente en los compuestos polifenólicos (ácido fenólico, flavonoides, antocianinas, lignanos, etc). Estos compuestos están relacionados como un sistema de defensa para el organismo, y por tanto son acumulados como respuesta frente al estrés por diferentes factores.

Además, presentan acción antioxidante, antiinflamatoria, antiviral y anticancerígena. Por ello los estudios se enfocan en la optimización de técnicas de extracción para obtener dichos compuestos bioactivos (Gómez et al., 2016).

Tabla 1.1: Estrategias de adaptación de las microalgas y cianobacterias, y compuestos activos generados como defensa en situaciones de estrés.

Estrategias de adaptación de las microalgas y cianobacterias	Compuesto activos potenciales
Lucha contra la deshidratación y regulación del flujo hídrico (estrés de desecación, variación de temperatura).	Minerales: Na, K, Cl y compuestos orgánicos: polioles, manosa, sacarosa, mucílago.
Protección contra los efectos de rayos ultravioleta y el estrés oxidativo.	Fibras naturales, antioxidantes (carotenoides, polifenoles, tocoferoles), enzimas anti radicales, Cu, Zn, Se.
Mantenimiento de la integridad de los tejidos en respuesta a condiciones climáticas.	Fibras, proteínas, mucílago y polisacáridos estructurales como el alginato, agar.
Mantenimiento de la integridad de los tejidos en respuesta a predadores.	Metabolitos secundarios halogenados: bromofenoles.

Fuente: (Ramírez, Actividad antioxidante de las microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Pediastrum* sp. como respuesta a la radiación UV y altitud de origen, 2018).

Elaboración: Autor, 2021.

Entre las especies más estudiadas están *Chlorella* y *Arthospira*, utilizadas en la elaboración de cremas debido a su propiedad fotoprotectora contra rayos ultravioleta UV, puesto que, en su estructura presenta gran cantidad de compuestos fenólicos y presencia de pigmentos, carotenoides, entre otros. Además, especies como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* han demostrado su poder de regeneración celular por la estimulación de síntesis de colágeno en el organismo (Cano et al., 2012).

Entre los compuestos aislados de cianobacterias que tienen actividad anticancerígena se encuentra las criptoficinas de *Nostoc sp.* Estos compuestos han demostrado que tienen actividades citotóxicas en ensayos clínicos, por lo que han sido candidatos para quimioterapias por sus propiedades anti-proliferativas (Microgreen, La Espirulina -Alimento Clave En Inmunonutrición- Podría Prevenir Infecciones Virales Como La Gripe Y El Coronavirus, 2020).

1.5.2 Determinación de la actividad antioxidante

La medida de la actividad antioxidante se puede valorar mediante la formación de productos intermedios o finales por la reacción entre el oxidante (radicales libres) y el antioxidante (sustancias naturales). De acuerdo al mecanismo de reacción, los ensayos pueden ser clasificados en dos categorías: ensayos a través de la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HTA) y a través de la transferencia de electrones (ET) que involucran una reacción de Oxido-Reducción. Estos ensayos miden la capacidad de atrapar radicales libres (Pedraza Chaverri & Cardenas, 2018).

1.5.2.1 Técnica de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

Este método se basa en la reducción del radical 2,2 -difenil -1- picrilhidrazilo (DPPH) que en presencia de una sustancia antioxidante produce un cambio de coloración

de una solución violeta a amarillo pálido. El compuesto DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad el DPPH se utiliza como referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

En consecuencia, la disminución de la absorbancia del DPPH es medida espectrofotométricamente a 520 nm y proporciona un índice para estimar la capacidad antioxidante del compuesto de prueba. La decoloración se debe a la cesión de electrones de la especie antioxidante que reacciona con el radical DPPH (Huang & Prior, 2005).

1.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC)

El método de Cromatografía de Capa Fina (TLC) se aplica para la caracterización de bandas cromatográficas que visualicen la actividad antioxidante de metabolitos bioactivos presentes en los extractos. La cromatografía es una técnica versátil y económica en laboratorios de análisis cualitativos y cuantitativos, particularmente su uso está enfocado en el monitoreo de reacciones, purificación de muestras y en la identificación de componentes de una mezcla compleja (Gutiérrez, 2002).

1.5.3.1 Fundamento

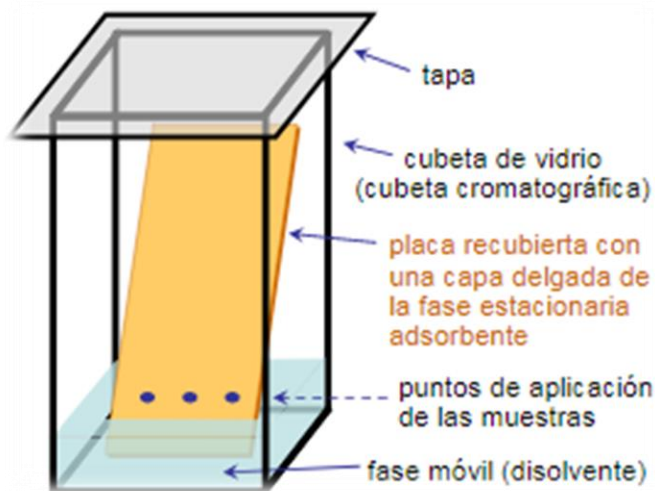
La cromatografía de capa fina es una técnica en donde la fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente de gel de sílice (SiO_2) o alúmina (Al_2O_3), adherido a un soporte de vidrio. El gel sílice tiene la particularidad de separar sustancias polares (alcoholes, ácidos carboxílicos, aminos); mientras que el de alúmina retiene con mayor fuerza componentes apolares (hidrocarburos, éteres, aldehídos y cetonas). Como consecuencia de las velocidades de migración, los

componentes de la muestra se separan en bandas que se pueden analizar en forma cualitativa o cuantitativa (Gutiérrez, 2002).

Para el desarrollo de la técnica se prepara la fase estacionaria y se coloca la muestra en disolución en puntos determinados de la parte inferior de la placa. La cromatoplaqueta se introduce en el recipiente cromatográfico, de manera que sólo la parte inferior de la placa quede sumergida en la fase móvil o eluyente y posteriormente ésta asciende por capilaridad por la fase estacionaria y los componentes se diferenciarán en solubilidad y en la fuerza de adsorción. Para la visualización de las bandas cromatográficas se puede usar reveladores correspondientes a cada componente de la muestra (luz ultravioleta o reactivos específicos) (Fernández, 2020; Gutiérrez, 2002).

En la cromatografía de capa fina los valores de factores de retención (R_f) son más reproducibles y se usa principalmente para la identificación de drogas, preparaciones bioquímicas y productos naturales (Fernández, 2020).

Figura 1.6: Ilustración de la cromatografía en capa fina.



Fuente y elaboración: (Gutiérrez, 2002).

1.5.3.2 Factor de retención (Rf)

El factor de retención (Rf) es el registro de la relación entre la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación y la distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente en el mismo tiempo, como indica la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Este valor depende de las condiciones de estudio sometidas (temperatura, vapor de saturación, cantidad de la muestra, etc.), así como las condiciones de la placa, tipo de adsorbente y eluyente. Por lo que el valor de Rf de un compuesto determinado es constante, permitiendo la identificación de distintas especies (Fernández, 2020).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

En el presente estudio se evaluó la eficiencia de la micronización y ultrasonido en la extracción de componentes bioactivos de seis extractos metanólicos a partir de tres especies de microalgas y cianobacterias aisladas en cuerpos de agua poco profundos de la región de EL Cajas, provincia del Azuay. Estas especies no tuvieron identificación taxonómica, por lo que se asignó códigos según el investigador que realizó la recolección.

Las microalgas y cianobacterias estudiadas fueron: *Flores #1* y *Tamariz #6* cultivadas en medio Blue Green-11 (BG-11) y *Tamariz #11* cultivada en medio de Wright (WC). Las especies aisladas fueron dispuestas para cultivo en mayor escala con el fin de obtener biomasa suficiente para el estudio (2 gramos de biomasa).

2.2 ETAPA DE CULTIVO

Los medios de cultivo se aplicaron de acuerdo a los requerimientos específicos de cada especie hasta la cosecha final de su biomasa.

2.2.1 Técnica de Cultivo

La preparación de los medios específicos de cultivo para cada microalga y cianobacteria (WC y BG-11) se detallan en el Anexo 1. A partir de la biomasa principal se realizó el cambio de medio, traspasando 100 ml de ésta a frascos de vidrio de 1 litro de capacidad conteniendo 900 ml de medio líquido previamente esterilizado (TUTTNAUER, USA). Las botellas para cultivo fueron selladas previo establecimiento de una línea de aireación, a temperatura establecida entre 26°C a 28°C, iluminación de 2300-2500 Lux (Cole-Parmer, Taiwán), agitación de 750-850

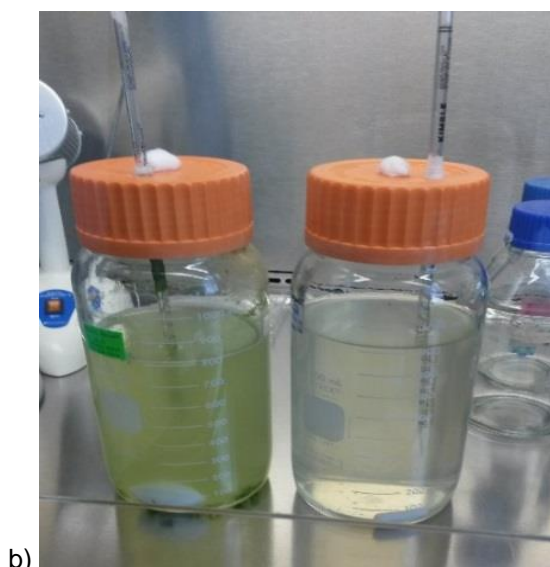
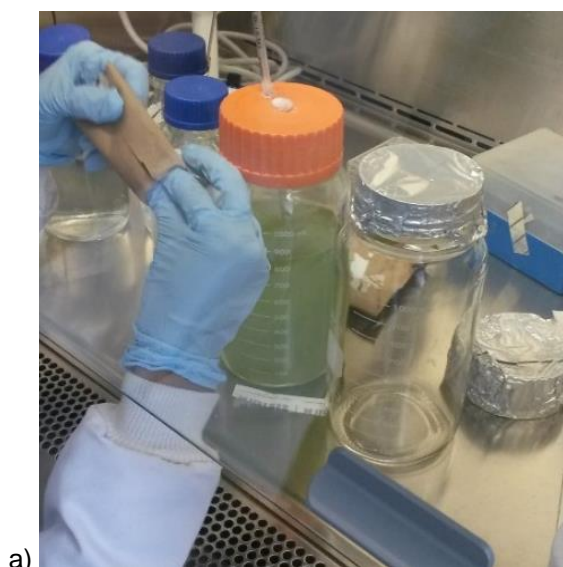
r.p.m. para que evitar la sedimentación y la adherencia a las paredes de los envases hasta la posterior cosecha según Tabla 2.1.

Figura 2.1: Montaje del cultivo de las microalgas.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 2.2: a) Muestra madre de las microalgas en estudio. b) Proceso de siembra de microalgas.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 2.1. Características de medios de cultivo en microalgas y cianobacteria, y tiempo de cambio/cosecha.

Código	Identificación	Tipo	Medio	Cambio/cosecha
MAAL33	Tamariz 6	Cianobacteria	BG-11	8–10 días
MAAL24	Flores 1	Cianobacteria	BG-11	12-15 días
MAAL29	Tamariz 11	Microalga	WC	8–10 días

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

2.2.2 Centrifugación (cosecha de biomasa).

Una vez transcurrido el tiempo de cambio-cosecha (Tabla 2.1) se procedió a centrifugar los cultivos de microalgas y cianobacterias a 3000 rpm por 5 minutos (Sigma, Alemania), separando por decantación el sobrenadante. El almacenamiento de la biomasa acuosa fue recolectado en tubos estériles después de centrifugar tres veces con agua destilada para mayor arrastre de biomasa. Posterior a este proceso se colocó la biomasa en los tubos respectivos para liofilizar.

2.3 LIOFILIZACIÓN

Para un mejor rendimiento en los análisis de la actividad antioxidante se realizó la liofilización de la muestra fresca previo a la extracción y posterior a la concentración de los extractos metanólicos obtenidos.

Para la liofilización de la biomasa fresca, los tubos de liofilización vacíos fueron pesados en la balanza analítica (Boeco, Alemania), y se colocó el volumen de los tubos estériles con biomasa acuosa, se añadió 10 ml de agua purificada y se congeló en el biofreezer (DAIREL, Dinamarca) a -80°C, hasta obtener una masa congelada homogénea en el tubo. Esta distribución se logra rotando los tubos por períodos de cinco minutos durante 20 a 30 minutos aproximadamente. Los tubos se almacenaron en el biofreezer durante 12 horas y luego fueron cargados en el liofilizador, previamente estabilizado a -52°C y 0.090 mBar. La liofilización de las muestras tardó un período de 24 horas según PNT FUN 004 de Laboratorio de

Fitoquímica Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Finalmente, la biomasa fue transferida a tubos de vidrio y se conservó a -20°C hasta su extracción.

Figura 2.3: Equipo de liofilización Freezone Labconco (Kansas City, Missouri).



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

2.4 ETAPA DE EXTRACCIÓN

En esta etapa se realizó la extracción de la biomasa (maceración en frío con metanol, aplicación de micronización y ultrasonido) y la concentración de los extractos (evaporación del solvente mediante rotavapor, corriente continua de Nitrógeno gaseoso y liofilización). Finalmente la biomasa extraída se almacenó en viales ámbar con la mezcla de compuestos químicos para su evaluación farmacológica.

2.4.1 Maceración

La maceración requirió de aproximadamente 2 g de biomasa y el solvente fue añadido en relación con el peso de la microalga y/o cianobacteria; así por cada gramo se agregó 30 ml del solvente de extracción. Finalmente, se maceró en reposo bajo campana de extracción a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.4.2 Ultrasonido

Posteriormente a la maceración, se aplicó el método de ultrasonido directo por 3 ciclos de 5 minutos, con una frecuencia de $>20\text{KHz}$ a 20°C . Las sondas ultrasónicas favorecen la velocidad en las reacciones químicas y la desintegración del material intracelular y tiene como objetivo lograr la extracción completa de sus metabolitos. Este proceso fue realizado en el laboratorio del PROMAS del departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Cuenca donde se encuentra el equipo de ultrasonido Ultrasonic Processor (Cole Parmer, USA).

Figura 2.4: Aplicación de la técnica de Ultrasonido.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

2.4.3 Micronización

Para comparar la eficiencia de extracción de los metabolitos activos de las microalgas y cianobacterias se aplicó la micronización que se realiza a través de una cámara de cuentas de vidrio, Bead Beater (Bio Spec Products, China) ver

Figura 2.5, la cual sigue un proceso estandarizado para lograr el mayor rompimiento celular de una muestra.

Para el desarrollo de esta técnica, la cámara debe contener una cantidad determinada de perlas de vidrio de diámetro específico, es importante colocar un refrigerante para conservar la temperatura. La manera más idónea de minimizar el calentamiento del homogeneizado es poniendo en funcionamiento la cámara con agua helada instalada, durante un minuto y luego dejar reposar el homogeneizado por otro minuto, ciclando así hasta que se complete el ciclo de homogeneización durante 3 veces (Bio Spec Products Inc., 2020).

Figura 2.5: Equipo Bead-Beater para micronización (Biospec Products, China).



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

La selección de tamaño de cuentas fue de 0.05 mm de diámetro de acuerdo a la similitud de las muestras con las bacterias. La disrupción total del material celular se realiza por el contacto del extracto con las perlas de vidrio a través de las revoluciones por minutos aplicadas en el equipo (Bio Spec Products Inc., 2020).

Al final de este proceso, se limpió exhaustivamente la cámara de policarbonato para evitar la corrosión del equipo. Las perlas deben ser esterilizadas en autoclave, pudiendo reusarse hasta diez veces. Se señala que el llenado de la cámara con las perlas de vidrio no debe sobrepasar los $\frac{3}{4}$ de la capacidad total y tampoco se debe usar combustibles inflamables que puedan causar daños en el equipo (Bio Spec Products Inc., 2020).

2.4.4 Filtración

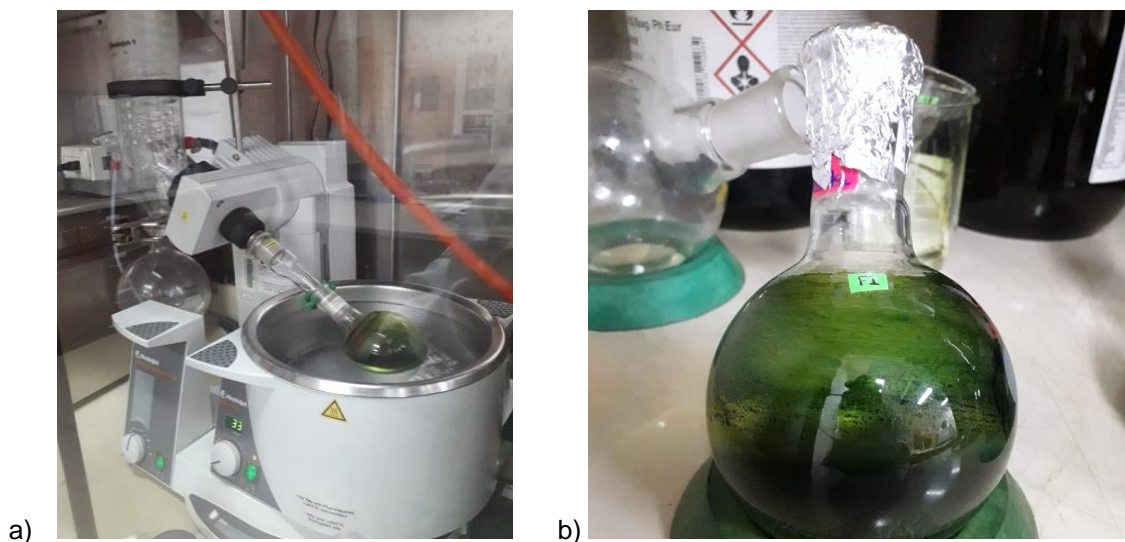
La filtración es la separación de partículas sólidas de un líquido impulsada por la fuerza gravitacional para que el líquido atraviese el filtro en un período de tiempo determinado.

Aplicando los métodos de extracción por separado, se filtró el pulverizado obtenido de cada método y el residuo sólido de cada filtración se volvió a sonicar en baño maría a 27-32°C (Cole-Parmer, México) por 5 horas cumpliendo 3 ciclos de este proceso. Finalmente, el filtrado total fue almacenado en balones de vidrio para el siguiente proceso de concentración.

2.5. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

La concentración de los principios activos de los extractos se realizó usando el *rotavapor* Laborota 4000 (Heidolph, Alemania) a 30°C y 90 rpm. El resultado de este proceso es un residuo seco adherido a las paredes del balón, el cual se redisolvió con 20 ml de metanol aproximadamente para seguir con la evaporación del solvente.

Figura 2.6: a) Equipo de rotavapor Laborota 4000 efficient Heidolph (Alemania) b) Balón con residuo seco final.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

La evaporación de la redisolución final se realizó en el baño ultrasónico a 30°C, bajo una leve corriente continua de nitrógeno; hasta obtener un volumen aproximado de 3 ml en los tubos de ensayo y se procedió a preparar la muestra para liofilizar.

Figura 2.7: Aplicación de corriente de nitrógeno gaseoso a muestras de redisolución.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Para la liofilización final se traspasó el contenido del tubo de ensayo al tubo de liofilización, se añadió 20 ml de agua purificada y se aplicó el mismo proceso detallado en el apartado 2.3.

Figura 2.8: Extractos de microalgas y cianobacterias liofilizadas.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Finalmente, se colocó las muestras liofilizadas en viales ámbar, obteniendo pesos entre 2,5 a 14.0 mg de extracto seco (peso constante) en la balanza analítica (Boeco, Alemania).

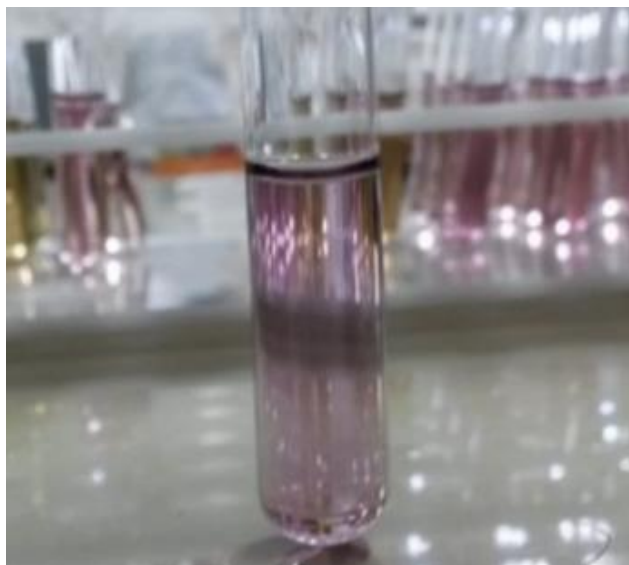
2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.6.1 Técnica de DPPH (captación de radicales libres).

2.6.1.1 Preparación de la solución de DPPH

La solución de DPPH requirió de 0.0012 g del reactivo aforado con metanol analítico a 50 ml. La lectura de absorbancia fue a 520 nm ($t=0$). La estabilidad de la solución reporta una duración estable de 6 horas posteriores protegida de la luz, la absorbancia normal de esta solución está entre 0,600 a 0,700.

Figura 2.9: Coloración violeta de solución de metanol y reactivo de DPPH.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

2.6.1.2 Elaboración de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se usó como patrón de referencia el ácido ascórbico y requirió 0.010 g de ácido ascórbico aforado a 100 ml con metanol de calidad análisis. La concentración de la solución fue de 100 ug/ml. A partir de la misma se preparó diluciones de concentración diferente (1-8 ug/ml), según Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Concentraciones de las diluciones de Ácido ascórbico para la curva de calibración.

Volumen de la solución madre (μ l)	Volumen de metanol (μ l)	Concentración (μ g/ml)
30	2970	1
60	2940	2
90	2910	3
120	2880	4
150	2850	5
180	2820	6

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Una vez preparadas las diluciones, se mezcló 1 ml de cada solución con igual volumen de reactivo de DPPH, se homogenizó y se dejó en reposo en la oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a 520 nm frente a un blanco de metanol. Todo esto se realizó por triplicado.

2.6.1.3 Preparación de los extractos

Para la preparación de un extracto a una concentración específica, se disolvió 1 ml de metanol en un vial con peso determinado, como ej. 5mg, la disolución tendrá una concentración de 5 mg/ml. A partir de este vial se coloca 40 µl en un tubo de ensayo más 1960 µl de metanol de análisis obteniendo una concentración de 100 µg/ml, con la cual se realizó el análisis de actividad antioxidante.

El espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific (Genesys, USA) debe estabilizarse 15 minutos previos a su uso, las lecturas de absorbancia fueron 520 nm de longitud de onda y se llevó a cero frente a un blanco de metanol. Se midió la absorbancia de la clorofila para luego realizar la corrección de las absorbancias con el reactivo de DPPH (lectura de la muestra – lectura de la clorofila).

Posteriormente, se colocó en partes iguales el extracto y la solución del reactivo de DPPH y se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad, posterior a ello se procedió a la lectura de cada muestra protegiéndolas de la luz, frente a un blanco de reactivo de DPPH más metanol, el cual indica una absorbancia de entre 0.350-0.375.

2.6.1.4 Expresión de los resultados

La capacidad antioxidante se expresó en miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 gramos de droga seca, expresada en la siguiente formula:

$$AAEAC = \frac{(As - Ac)(Fd)(V)}{K.m}$$

Dónde:

As: absorbancia de cada muestra 30 min

Ac: absorbancia del control (DPPH + MeOH).

m: peso en miligramos del extracto inicial de los viales.

V: volumen en ml del contenido en el vial.

Fd: factor de dilución de cada concentración de extracto.

K: pendiente de la curva de calibración de ácido ascórbico.

AAEAC: miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 g de droga seca (mg/g)
(Leong & Shui, 2002).

2.6.2 Cromatografía de capa fina (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY-TLC)

El objetivo de esta técnica es la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases; una fase móvil-líquida que transporta las sustancias que se separan y que progresan en relación con la otra, llamada fase estacionaria-sólida (Fernández, 2020).

Para el análisis de cromatografía de capa fina se siguió el siguiente proceso:

2.6.2.1 Preparación de placas para TLC

Las placas de TLC de sílica gel con soporte de vidrio fueron activadas en la estufa a 100 °C durante 15 horas, la línea de siembra se trazó a 1 cm del borde inferior y a 8 cm de ésta se trazó la línea de frente del solvente para el recorrido de los metabolitos. La identificación del metabolito a investigar, la fase móvil y el revelador empleado se colocó en el borde superior mientras que los códigos de cada extracto a analizar se colocaron en la parte inferior.

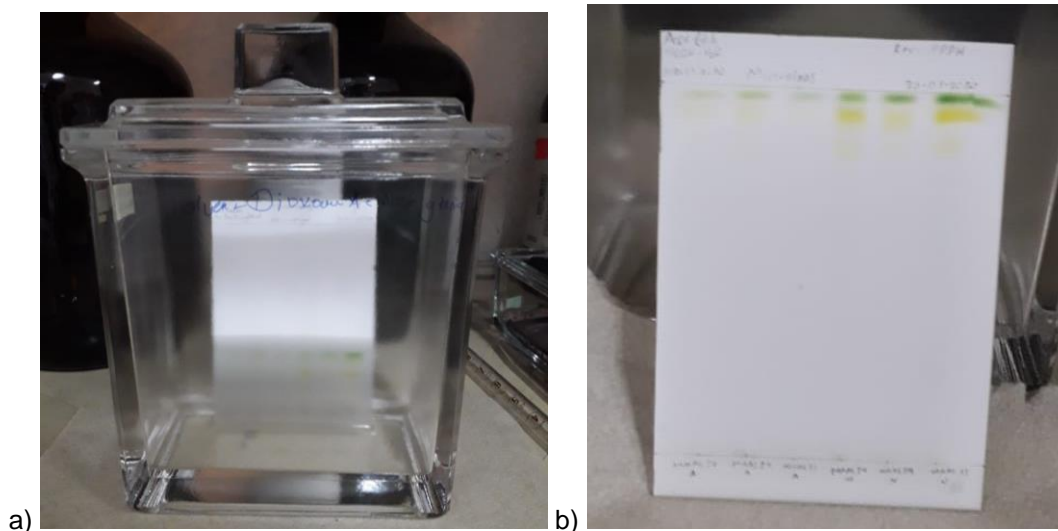
2.6.2.2 Aplicación de la muestra

La muestra procedente de un vial de extracto de microalgas y cianobacterias fue de concentración 5 mg/ml en metanol, preparada de la misma forma detallada en el apartado **2.6.1.3**. En la línea de siembra se colocó 5 μ l de cada extracto a 1 cm de distancia entre sí, y a 1 cm de distancia del borde inferior de la placa.

2.6.2.3 Elución sobre placa

Las fases móviles fueron preparadas de acuerdo a la referencia obtenida en la tabla 2.3. Previamente, se colocó la fase móvil en la cámara de vidrio 30 minutos antes de la introducción de la placa de TLC en forma vertical, a 0.5cm del borde inferior al contacto con la fase móvil y se cerró hasta que la fase móvil ascienda hasta la línea de frente. Retirada la placa de la cámara, se secó bajo la campana de extracción de vapores hasta evaporación total de la fase móvil, procesos que se detallan en los PNT OG014 y PNT OG011 del laboratorio de Fitoquímica del proyecto VLIR de Plantas Medicinales.

Figura 2.10: a) Cámara de cromatografía de capa fina (TLC). b) Placa sílica gel con bandas cromatográficas de microalgas y cianobacterias.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

2.6.2.4 Revelado postcromatográfico

Para facilitar la visualización de los compuestos de las muestras se requieren de reveladores específicos para cada metabolito, los cuales se detallan en la tabla 2.3. El revelador se colocó en una fuente de vidrio, en donde la placa de TLC se sumergió e inmediatamente se extrajo para el secado en la cabina de extracción y poder visualizar las placas en el equipo de fotodocumentación a diferentes longitudes de onda; 254 nm, 366 nm y luz visible.

Tabla 2.3: Identificación y separación de metabolitos activos en cromatografía de capa fina.

Fase móvil	Metabolito a investigar	Reveladores	Identificación	Extractos (5mg/ml)
Tolueno- Cloroformo- Etanol (40-40-10)	Tritúrenos	Anisaldehído- Ácido Sulfúrico	A luz visible: azul, verde, rojo y café.	Tamariz 6-A Tamariz 11-A Flores 1-A Tamariz 6-N Tamariz 11-N Flores 1-N
Acetato de etilo-Metanol- Agua (100-13.5-10)	Antioxidantes	DPPH	A luz visible: amarillo.	
Tolueno- dioxano-ácido acético glacial (90:25:4)	Flavonoides	Productos naturales	A 366nm: <i>Flavonas</i> : tomate, amarillo, verdoso. <i>Flavolones</i> : tomate, amarillo, amarillo-verdoso. <i>Flavonoles</i> : Tomate, amarillo, amarillo-verdoso.	

Fuente: (Wagner & Bladt, 1996).

Elaboración: Autor, 2021.

CAPITULO III

3. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA

El porcentaje de rendimiento de biomasa concentrada a partir de biomasa acuosa se detalla en las siguientes tablas:

Tabla 3.1: Resultados de rendimiento de biomasa extraída por Micronización.

Identificación	Biomasa acuosa (g)	Biomasa concentrada (g)	Rendimiento (%)
Flores #1	16.92	14.24	84.14
Tamariz #6	24.17	16.01	66.26
Tamariz #11	27.56	16.72	60.68

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.2: Resultados de rendimiento de biomasa extraída por Ultrasonido.

Identificación	Biomasa acuosa (g)	Biomasa concentrada (g)	Rendimiento (%)
Flores #1	2.093	0.319	15.24
Tamariz #6	2.091	0.468	22.38
Tamariz #11	2.072	0.341	16.46

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Se puede apreciar que el rendimiento obtenido por el método de Micronización presenta mayor porcentaje que el obtenido por Ultrasonido. Esta diferencia se debería a que el ultrasonido provoca la implosión de las burbujas, las cuales entran en contacto sobre la superficie celular de microalgas y cianobacterias, alterando la

permeabilidad de la membrana y libera los analitos intracelulares, pero no lo hace de forma eficiente como se origina por el método de micronización. En donde, las perlas de vidrio colisionan directamente con la muestra por lo que existe mayor contacto con las células y el fraccionamiento celular total resulta en mayor liberación de los componentes intracelulares. La ventaja de la Micronización es que se realiza en ciclos de menor tiempo y la temperatura se mantiene estable por lo que no se produce la pérdida o desnaturalización de componentes bioactivos (Biospec, BeadBeater: instrucciones de operación, 2020).

La principal desventaja del baño de ultrasonido, es que generalmente funciona a una sola frecuencia (20 o 40 kHz) y la producción de calor inestable podría inducir la formación de radicales libres que degradan a los compuestos bioactivos. (Glembin, Kerner, & Smirnova, Cloud point extraction of microalgae cultures, 2013).

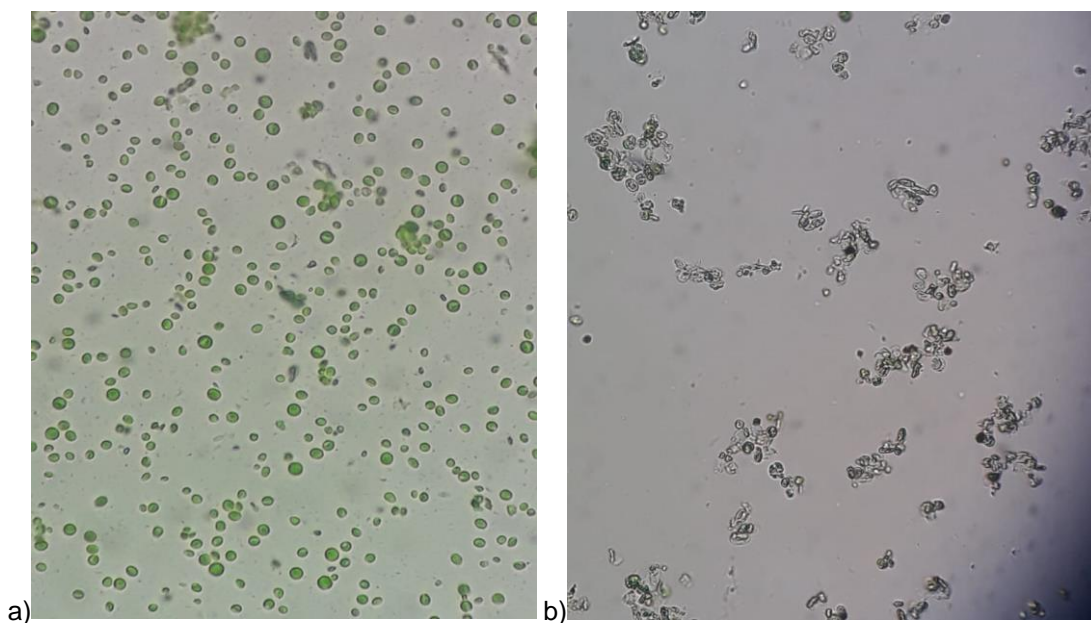
En la investigación del “Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la microalga *Scenedesmus sp.*” se caracterizó el contenido de ficobiliproteínas (FBPs) con respecto al fraccionamiento celular; en donde los cultivos de microalgas fueron sometidos a dos tipos de rompimiento celular (homogenización y sonicación) y posteriormente liofilizadas. Además, se observó que las células sometidas a homogenización presentaron rompimiento; mientras que, las sometidas a sonicación no presentaron dicha ruptura. Asimismo, el contenido de FBPs presentes en las muestras obtenidas por homogenización presentó mayor rendimiento frente a aquellas tratadas por sonicación (Bermudez Sierra, Oliveira Leite, Do reis Coimbra, & Aredes Martins, 2013).

Un estudio de la “Extracción de lípidos a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*” determina que mientras el diámetro de las cuentas de vidrio disminuye, el rendimiento de extracción se incrementa ya que el rompimiento celular fue eficiente. Esta tendencia se justifica debido a que, si disminuye el tamaño de las cuentas, la cantidad de las mismas es mayor dentro de la cámara, de tal manera que la superficie de contacto entre las células y las cuentas aumenta, provocando mayor número de colisiones y el incremento en la extracción de componentes bioactivos.

El incremento que presentó fue del 30% con respecto al proceso de extracción con biomasa sin rompimiento previo. Para procesos industriales el diámetro de balines recomendado es de 0.4 y 0.6 mm de diámetro (Alba Quiñones, 2013).

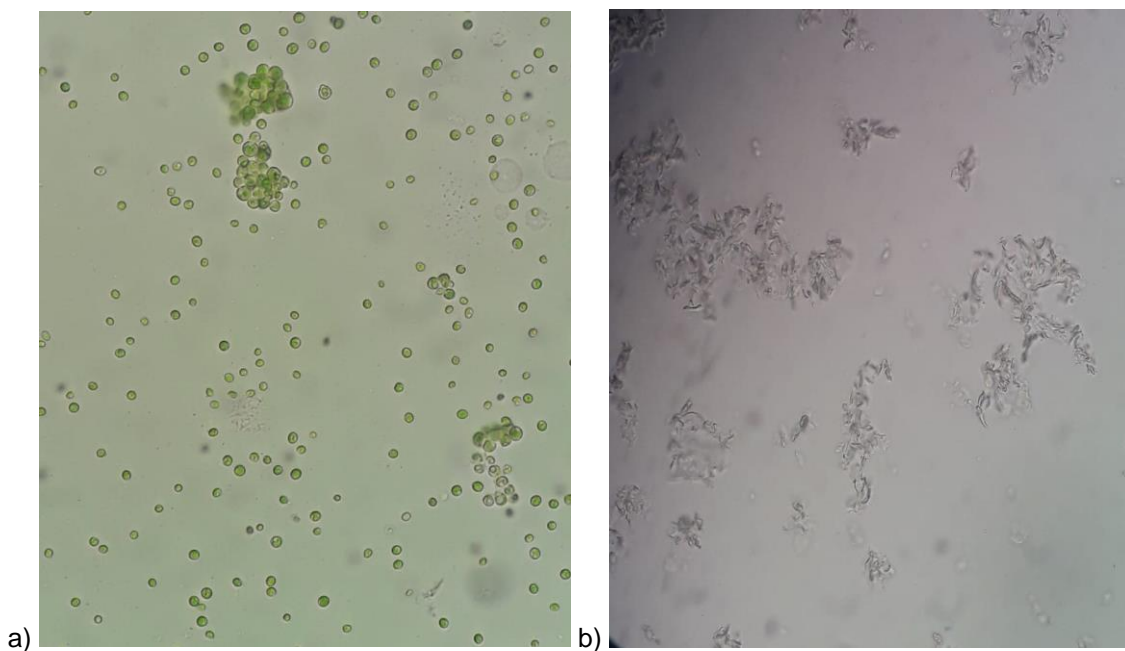
3.2 RESULTADOS DE MICROALGAS TRATADAS POR MICRONIZACIÓN

Figura 3.1: Fotos TAMARIZ #11 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).



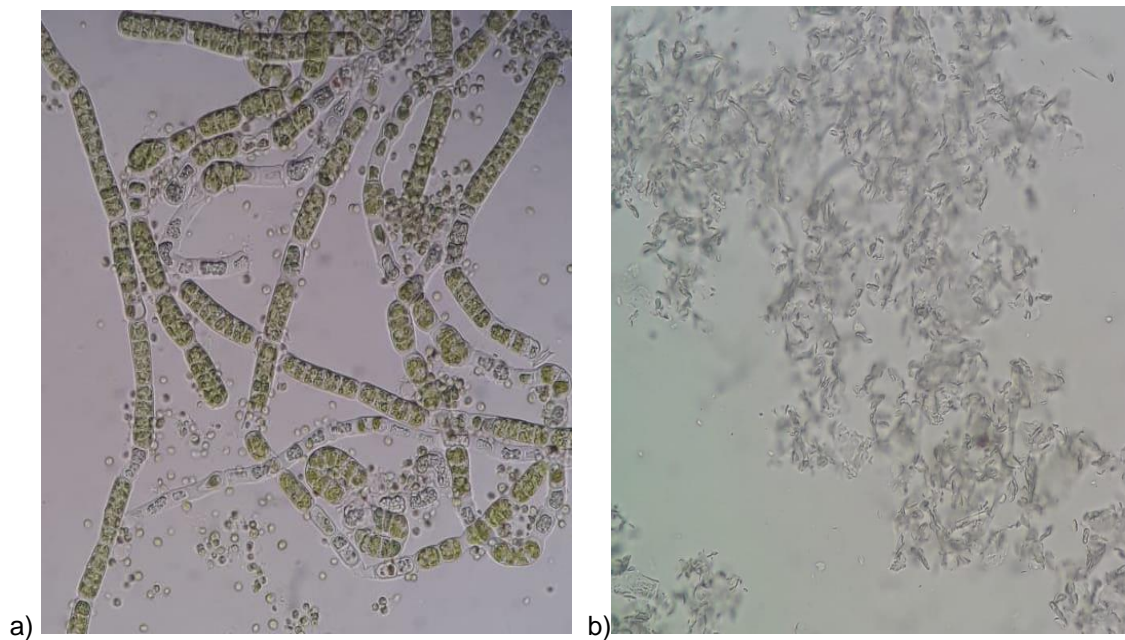
Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 3.2: Fotos TAMARIZ #6 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 3.3: Fotos FLORES #1 pretratamiento (a) y post tratamiento-micronización (b).



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

En las fotografías en microscopio con aumento de 40X, se observó que la microalga posee una estructura definida antes de la micronización, pero al entrar en contacto con las cuentas de vidrio en agitación constante se produce la fragmentación y la membrana celular se destruye.

En efecto, un estudio realizado por S. Lee et al. evaluó varios sistemas de destrucción mecánica para la extracción de lípidos de la microalga *Botryococcus braunii*, concluyendo que el mayor porcentaje de extracción se obtuvo al utilizar un molino de bolas de cristal de 1mm, durante 1 minuto. De esta forma se obtuvieron un contenido de lípido del 28.6% por biomasa seca (Lee, Yoo, Jun, Ahn, & Oh, 2010).

3.3 RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la evaluación de la actividad antioxidante en extractos metanólicos de microalgas y/o cianobacterias se empleó la técnica descrita en el apartado 2.6.1 y se obtuvieron los siguientes resultados.

3.3.1 Validación de curvas de calibración de ácido ascórbico empleadas para la determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazilo)

Mediante la aplicación de la metodología descrita en el apartado 2.6.1.2, se construyeron seis curvas de calibración con seis patrones de concentración de 1 – 6 µg/ml. El patrón de referencia fue el ácido ascórbico.

Para la representación de la actividad antioxidante del ácido ascórbico se consideró la curva detallada en la figura 3.4., en donde el coeficiente de determinación o correlación R^2 fue de 0.9938.

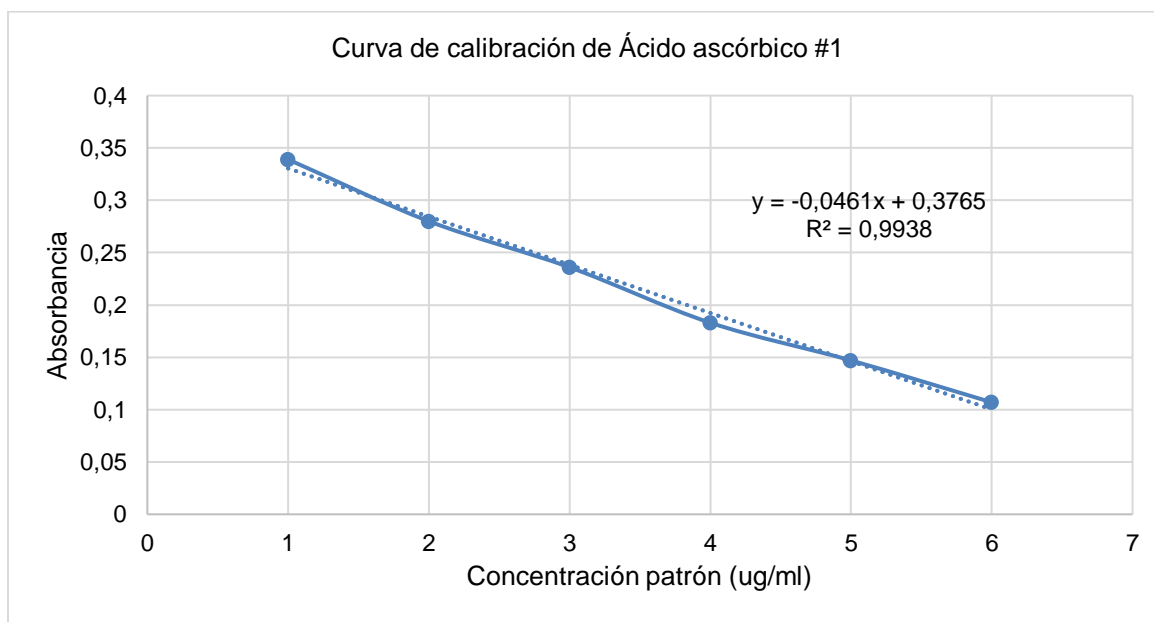
Los valores de absorbancias por triplicado de la curva de calibración se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3.3: Absorbancias de curva de calibración del ácido ascórbico por técnica de DPPH.

Absorbancia control	Concentración Patrón	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media Absorbancia	Desviación estándar
nm	ug/ml	Abs	Abs	Abs	Abs	
0,366	6	0,094	0,116	0,111	0,107	0,009
	5	0,149	0,145	0,147	0,147	0,002
	4	0,175	0,175	0,198	0,183	0,010
	3	0,235	0,244	0,248	0,242	0,005
	2	0,272	0,284	0,285	0,280	0,006
	1	0,322	0,34	0,339	0,334	0,008

Fuente y elaboración: Autor, 2021

Figura 3.4: Curva de calibración del ácido ascórbico mediante la técnica de DPPH.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

La tendencia lineal de las curvas de calibración se observa a través del coeficiente de determinación R^2 el cual mide la relación lineal entre dos variables medidas; siendo satisfactoria cuando este valor se acerca a 1. En las diferentes curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de determinación con valores superiores a 0,97 (Anexo 2).

3.3.2 Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante expresados en AAEAC

La actividad antioxidante fue determinada a través del método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) mencionado en el apartado 2.6 y se observó que los 6 extractos de microalgas y cianobacterias estudiados presentaron actividad antioxidante, lo que evidenció la capacidad de inhibir el radical DPPH a la concentración de ensayo analizada (100 $\mu\text{g/ml}$). Para establecer las posibles diferencias entre las especies de microalgas y cianobacterias con respecto a su capacidad antioxidante, se tomó en cuenta el AAEAC que nos indica los miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 g de droga seca (mg/g).

3.3.2.1 Resultados de AAEAC para extractos obtenidos por ultrasonido

Tabla 3.4: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #6.

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 $\mu\text{g/ml}$	0,042	0,36	0,318	0,320	0.004	68	14,169
	0,047	0,372	0,325				
	0,046	0,362	0,316				
100 $\mu\text{g/ml}$	0,044	0,361	0,317	0,317	0.001	69	15,018
	0,039	0,355	0,316				
	0,041	0,36	0,319				
100 $\mu\text{g/ml}$	0,043	0,362	0,319	0,318	0.003	67	14,927
	0,048	0,361	0,313				
	0,045	0,366	0,321				

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.5: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #11

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 ug/ml	0,093	0,392	0,299	0,301	0.002	56	19,414
	0,091	0,393	0,302				
	0,092	0,395	0,303				
100 ug/ml	0,076	0,377	0,301	0,296	0.004	51	20,879
	0,075	0,368	0,293				
	0,077	0,371	0,294				
100 ug/ml	0,098	0,395	0,297	0,299	0.002	55	19,963
	0,093	0,392	0,299				
	0,094	0,396	0,302				

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.6: Resultados de absorbancias y AAEAC de FLORES #1

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 ug/ml	0,051	0,388	0,327	0,324	0.002	27	13,187
	0,058	0,382	0,324				
	0,055	0,376	0,321				
100 ug/ml	0,059	0,378	0,319	0,316	0.004	29	15,385
	0,053	0,363	0,310				
	0,054	0,373	0,319				
100 ug/ml	0,061	0,381	0,320	0,317	0.002	30	15,018
	0,056	0,372	0,316				
	0,058	0,374	0,316				

Fuente y elaboración: Autor, 2021

3.3.2.2 Resultados de AAEAC para extractos obtenidos por micronización

Tabla 3.7: Resultados de AAEAC absorbancias y de TAMARIZ #6.

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 ug/ml	0,226	0,304	0,078	0,073	0.004	112	72,04
	0,238	0,307	0,069				
	0,237	0,309	0,072				
100 ug/ml	0,214	0,319	0,105	0,103	0.004	112	64,81
	0,219	0,317	0,098				
	0,215	0,321	0,106				
100 ug/ml	0,213	0,322	0,109	0,116	0.005	112	61,76
	0,218	0,332	0,114				
	0,221	0,345	0,124				

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.8: Resultados de absorbancias y AAEAC de TAMARIZ #11.

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 ug/ml	0,286	0,33	0,044	0,046	0.002	132	78,474
	0,279	0,328	0,049				
	0,283	0,329	0,046				
100 ug/ml	0,283	0,325	0,042	0,041	0.002	132	79,759
	0,285	0,323	0,038				
	0,286	0,329	0,043				
100 ug/ml	0,276	0,33	0,054	0,055	0.003	132	76,305
	0,279	0,332	0,053				
	0,282	0,341	0,059				

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.9: Resultados de absorbancias y AAEAC de FLORES #1.

Concentración	Absorbancia clorofila	Absorbancia con DPPH	Absorbancia corregida	Media	Desviación estándar	Factor de dilución	AAEAC (mg/g)
100 ug/ml	0,378	0,477	0,099	0,098	0.001	142	66,104
	0,374	0,472	0,098				
	0,385	0,481	0,096				
100 ug/ml	0,384	0,483	0,099	0,098	0.003	142	65,944
	0,395	0,489	0,094				
	0,379	0,481	0,102				
100 ug/ml	0,398	0,502	0,104	0,100	0.003	142	65,542
	0,401	0,499	0,098				
	0,397	0,495	0,098				

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 3.10: Resultados de comparación de los promedios de actividad antioxidante de los diferentes extractos mediante Ultrasonido y Micronización.

Microalgas/cianobacterias	Método Ultrasonido	Método Micronización
	AAEAC	AAEAC
Código del extracto	(mg/g)	(mg/g)
FLORES #1	14,53	67,52
TAMARIZ #6	14,71	66,20
TAMARIZ #11	20,08	73,17

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Los valores obtenidos del AAEAC son variables, comprenden un rango de 14,53 mg/g – 20,08 mg/g para ultrasonido y entre 66,20 mg/g – 73,17 mg/g para micronización, estos resultados indicaron que existe un incremento notable en la actividad antioxidante por micronización.

Se realizó un análisis estadístico de Prueba de Hipótesis para comprobar la efectividad de los métodos de extracción, teniendo en cuenta las muestras recopiladas para esta investigación. Por lo cual es necesario indicar que se utilizó la prueba T de student debido a la diferencia de los resultados y la cantidad de muestras que se tomaron por cada tipo de método.

Para el desarrollo de la prueba se planteó las siguientes hipótesis:

- Hipótesis Nula H_0 : no existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante usando el método de micronización en comparación con el método de ultrasonido
- Hipótesis Alternativa H_1 : Existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante usando el método de micronización en comparación con el método de ultrasonido.

Para dicho análisis, es necesario recalcar que se consideró un nivel de significancia igual a 0.05; además de tomar en cuenta la diferencia en las muestras de las dos técnicas de extracción y posteriormente obtener una media y desviación estándar muestral que nos permitirían obtener el parámetro estadístico “t” y, posteriormente el cálculo respectivo del p-Valor.

Tal análisis lo podemos observar en la siguiente tabla:

Tabla 3.11: Resultados de prueba T student de la actividad antioxidante de las microalgas y cianobacterias.

	Ultrasonido	Micronización	Diferencia	X	Desv. Est	CV	t	P
100 ug/ml	14,169000	72,040000	57,871	51,498667	10,018996	15,42%	8,90292	0,00327
	15,018000	64,810000	49,792					
	14,927000	61,760000	46,833					
	Ultrasonido	Micronización	Diferencia	X	Desv. Est	CV	t	P
100 ug/ml	19,414000	78,474000	59,060	58,094000	13,727771	19,96%	7,32980	0,00062
	20,879000	79,759	58,880					
	19,963000	76,305000	56,342					
	Ultrasonido	Micronización	Diferencia	X	Desv. Est	CV	t	P
100 ug/ml	13,187000	66,104000	52,917	51,333333	9,324617	15,67%	9,53518	0,00434
	15,385000	65,944000	50,559					
	15,018000	65,542000	50,524					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

En cada situación de análisis obtuvimos como resultado un p-valor menor a 0.05; en consecuencia, se rechazó la Hipótesis Nula y se aceptó la Hipótesis Alternativa, que nos indica que la efectividad de la extracción por el método de Micronización, es superior a los resultados obtenidos por el método de Ultrasonido.

Cabe recalcar que la especie microalga TAMARIZ #11 presenta mayor porcentaje de AAEAC que las demás especies, 20.08 mg/g a través de Ultrasonido y 73,17 mg/g por Micronización; lo que supone mayor actividad biológica en esta especie.

Hemalatha *et al.* en su investigación de “*Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, Navicula clavata and green microalgae, Chlorella marina and Dunaliella salina*” determinaron que el resultado de actividad antioxidante para *C. marina* y *D. salina* fue AAEAC de 1.03 y 0.96 mg/g de ácido ascórbico en extracto

metanólico y la actividad más baja se observó en el extracto de *N. clavata* con un AAEA de 0.50 mg/g, por lo que las especies con mayor actividad captadora de radicales libres a través del método de DPPH fueron *C. marina* y *D. salina*. (Hemalatha, Girija, Parthiban, & Saranya , 2013). Estos resultados nos apoyan como referencia de que existe actividad antioxidante en los extractos de microalgas y cianobacterias.

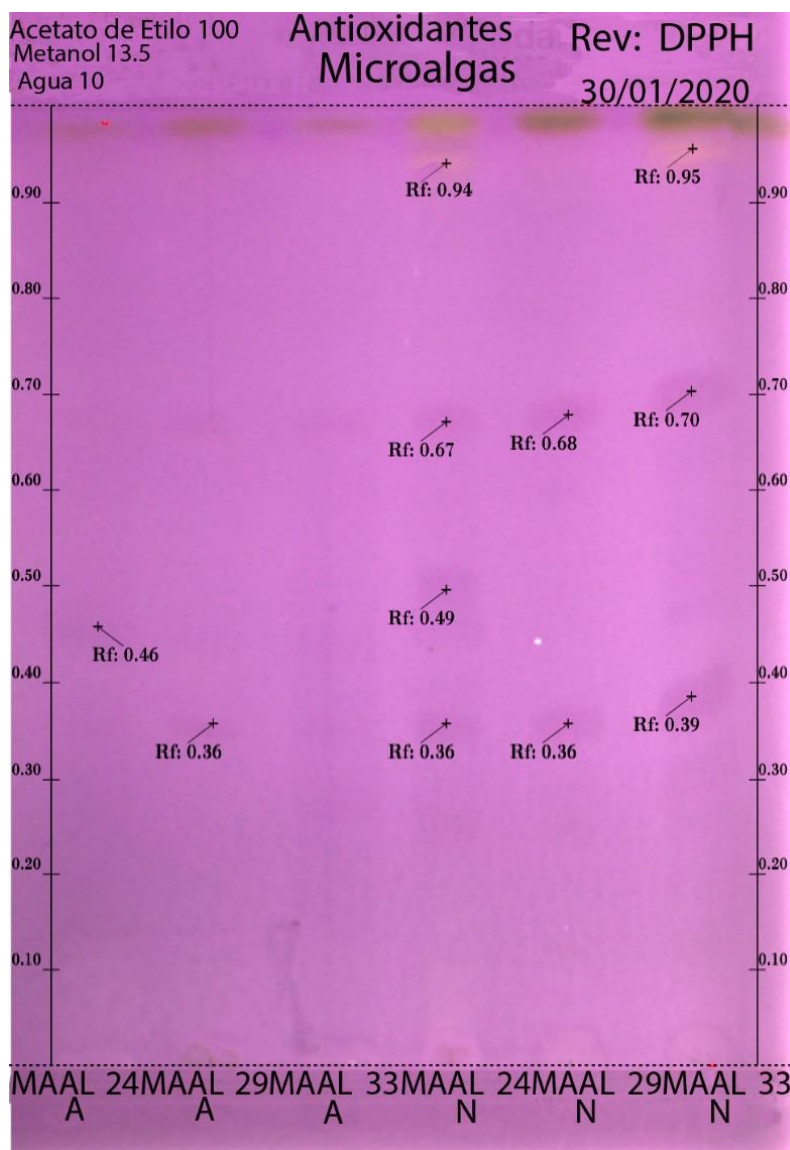
Aunque no todos los grupos de microalgas y cianobacterias se pueden usar como fuente de potencial antioxidante, debido a la variedad de componentes que poseen y a la información limitada sobre la actividad de estos microorganismos, se busca impulsar a fondo la investigación y alcanzar mayor implicancia en el rol farmacológico para el desarrollo de productos innovadores procedentes de fuentes naturales.

3.4 RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) según la metodología descrita en el apartado 2.6.2, permite la identificación cualitativa de los metabolitos bioactivos en las microalgas y cianobacterias analizadas, para lo cual se emplearon seis extractos metanólicos obtenidos por Ultrasonido y Micronización.

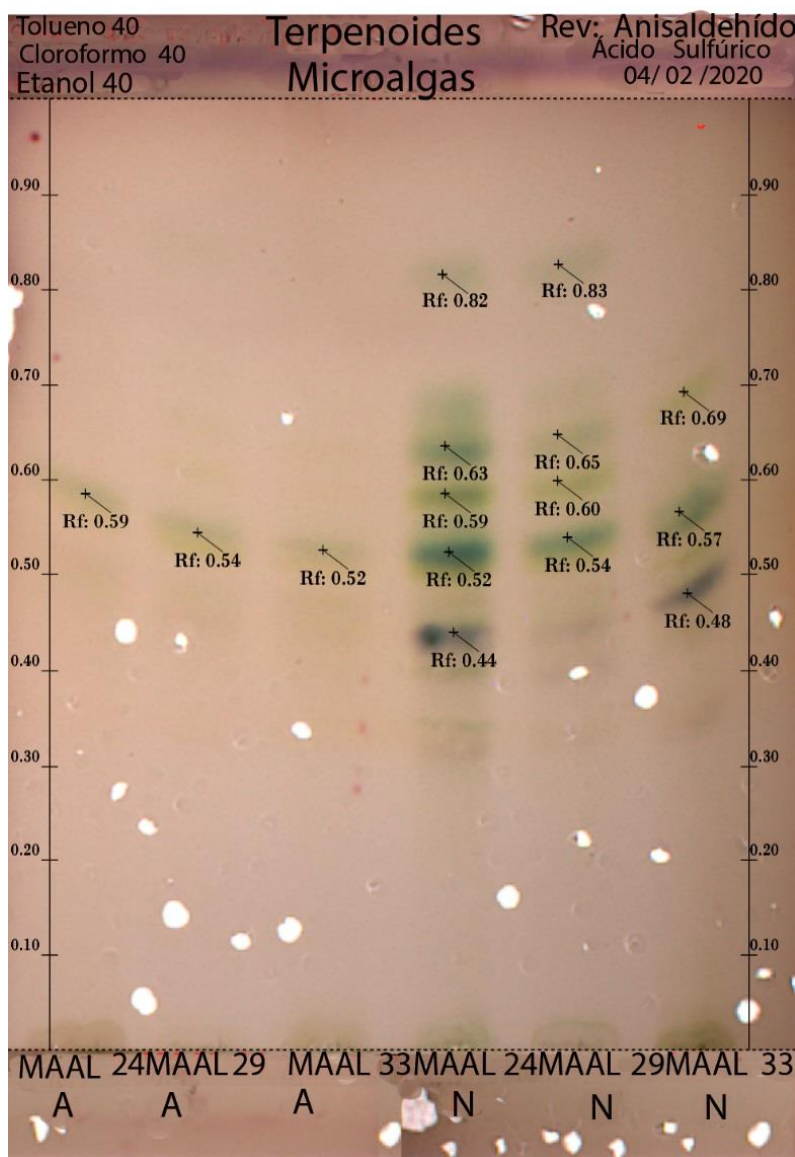
Los metabolitos investigados fueron: antioxidantes y terpenoides, se emplearon fases móviles y reveladores específicos para cada metabolito detallados en la tabla 2.3. El revelado y foto documentación de las placas cromatográficas fue específicamente bajo espectro visible y el análisis fue cualitativo basado en la visualización de la intensidad de bandas cromatográficas para cada método.

Figura 3.5: Cromatograma en espectro visible para Antioxidantes, revelador DPPH en los extractos metanólicos de microalgas y cianobacterias codificadas de la siguiente forma: FLORES 1 (MAAL24), TAMARIZ 11 (MAAL29) Y TAMARIZ 6 (MAAL33). A la derecha se encuentra el corrimiento de los extractos obtenidos por Micronización y a la izquierda se encuentra los que fueron obtenidos por Ultrasonido.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 3.6: Cromatograma en espectro visible para terpenoides, revelador Anisaldehído-Ácido Sulfúrico en los extractos metanólicos de microalgas y cianobacterias codificadas de la siguiente manera: FLORES 1 (MAAL24), TAMARIZ 11 (MAAL29) Y TAMARIZ 6 (MAAL33). A la derecha se encuentra el corrimiento de los extractos obtenidos por Micronización y a la izquierda se encuentra los que fueron obtenidos por Ultrasonido.



Fuente y elaboración: Autor, 2021.

En la placa de antioxidantes usando como revelador DPPH se observan bandas con RF entre 0.36 - 0.70 (Figura 3.6). Y en la placa de Terpenoides usando como revelador Anisaldehído-Ácido Sulfúrico se observaron bandas con RF entre 0.52 - 0.82 (Figura 3.7), lo que indicaría la presencia de compuestos antioxidantes como: clorofilas, xantofilas, compuestos fenólicos, etc., metabolitos que se encuentra en la mezcla de componentes de las microalgas y cianobacterias, que se han estudiado por la actividad antioxidante relacionada a estos microorganismos (Llopiz, 2016).

Además, la cromatografía permitió visualizar coloraciones amarillas en el cromatograma de Antioxidantes con un RF entre 0.94 - 0.95 (Figura 3.6), presumiblemente por la presencia de componentes antioxidantes; ya el DPPH se decolora de violeta a amarillo cuando reacciona con un antioxidante. Las especies que muestran esta actividad son: FLORES #1 y TAMARIZ #6.

En cuanto al cromatograma para Terpenoides de la Figura 3.7, se observa bandas con coloraciones azul-violáceas con un RF entre 0.44 - 0.48; probablemente porque existen compuestos terpenoides que entran en contacto con el Anisaldehído-Ácido produciendo esta coloración y se atribuye actividad antibacteriana y antioxidante. Las especies que muestran esta actividad son: FLORES #1 y TAMARIZ #6 (Wagner & Bladt, 1996).

De esta manera, la intensidad de las bandas cromatográficas indica que la micronización logró extraer eficientemente compuestos bioactivos revelados en las placas a diferencia del ultrasonido; apoyando a la hipótesis planteada que la Micronización es el método de elección para el rompimiento celular en microalgas y cianobacterias debido a la mayor intensidad de las bandas cromatográficas visualizadas en los extractos obtenidos por micronización.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- En base al análisis realizado, comparando las técnicas de fraccionamiento de Micronización y Ultrasonido aplicados a los extractos metanólicos de microalgas y cianobacterias, se concluye que, la técnica de Micronización presentó eficiencia superior a la técnica de Ultrasonido debido al mayor rompimiento microscópico celular, mayor actividad antioxidante y mayor presencia de manchas cromatográficas en las placas de cromatografía.
- El análisis de los resultados de los dos métodos de extracción verifica que existe actividad antioxidante en las tres especies de microalgas y cianobacterias analizadas, sin embargo, la micronización ofrece mayor eficiencia, debido a que la concentración de los metabolitos liberados y la evaluación de la actividad antioxidante de los mismos mediante el AAEAC, resultó ser mayor por este método.
- La recomendación principal consecuente de la presente investigación nos permite sugerir a la técnica de Micronización para la extracción de componentes bioactivos de microalgas y cianobacterias por la eficiencia de la actividad antioxidante investigada.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere la identificación y caracterización de las especies de microalgas y cianobacterias para aprovechar con mayor profundidad su potencial farmacológico.

5. BIBLIOGRAFÍA:

- Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., & Heyden, Y. V. (2016). Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchemical Journal*, 128, 208-217.
- Alba Quiñones, C. (2013). Extracción de lípidos a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (Junio de 2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010
- Azhmir, L., Zaidul, M., Sharif, K., Mohamed, A., & Sahena, F. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds for plant materials: A review.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor and Francis group.
- Básaca-Loya, G., Valdez, M., Enríquez-Guevara, E., Gutiérrez-Millán, L., & Burboa, M. (2009). Extraction and purification of B-phycoerithrin from the red microalga *Rhodospirillum rubrum*. 359-368. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802009000400004&lng=es&tlng=.
- Bermudez Sierra, J. J., Oliveira Leite, M., Do reis Coimbra, J. S., & Aredes Martins, M. (2013). Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *Scenedesmus* sp. 2(8), 65-79.
- Bermúdez, I. (Octubre de 2012). *Efecto de diversos parámetros del proceso de sonicación, seguido de un almacenamiento en alta presión osmótica, sobre la reducción de Salmonella Typhimurium y Lactobacillus rhamnosus en soluciones modelo y su aplicación en jugos de frutas*. Obtenido de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/2589/1/34692.pdf>
- Bio Spec Products Inc. (2020). Homogeneizador y disruptores celulares . (BioSpecProducts, Ed.) Obtenido de <https://biospec.com/instructions/beadbeater>
- Biospec. (2020). BeadBeater: intrucciones de operación. *Biospec Products*. Obtenido de <https://biospec.com/instructions/beadbeater>

- Blas, V., Ortiz, R., Pineda, M., Hernandez, A., & Cano, E. (2011). *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl₂ caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *Journal Phycology*, 53-58.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, D. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 25-30.
- Cano, E., Blas, V., Rodriguez, R., Torres, P., Franco, M., Hernández, A., & Ortiz, R. (2012). Uso terapéutico de algunos microorganismos, microalgas, algas y hongos. *Redalyc*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/579/57928311004/>
- Chepurnova, O. (2000). Culture Medium for Freshwater Diatoms. *Journal Gand Bélgica*.
- Criollo, K., & Molina, J. (2016). *Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de secado de Jungia rugosa*. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25980/1/tesis.pdf>
- Doucha, J., & Livansky, K. (2005). *Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (Chlorella sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor*. (Vol. 17). *J Appl Phicol*. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=2MDEBAAAQBAJ&pg=PA237&lpg=PA237&dq=Doucha+%26+Livansky,+2011\).&source=bl&ots=U-fLlo0iFX&sig=ACfU3U19cbzcoqY4XWT3L5QdHaMKGbAKw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjnl-CKi5juAhXmwVvKHbk3CiwQ6AEwDnoECBIQAg#v=onepage&q=Doucha%20%26%20L](https://books.google.com.ec/books?id=2MDEBAAAQBAJ&pg=PA237&lpg=PA237&dq=Doucha+%26+Livansky,+2011).&source=bl&ots=U-fLlo0iFX&sig=ACfU3U19cbzcoqY4XWT3L5QdHaMKGbAKw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjnl-CKi5juAhXmwVvKHbk3CiwQ6AEwDnoECBIQAg#v=onepage&q=Doucha%20%26%20L)
- Fernández, A. S. (Mayo de 2020). *Cromatografía en un laboratorio de química orgánica*. *Elsevier*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/341718125_CROMATOGRAFIA_EN_CAPA_FINA_Y_COLUMNA
- GIDOLQUIM. (2014). *Departamento de Química Inorgánica Barcelona, Universitat de Barelona*. Obtenido de <http://www.ub.edu/talq/es/node/262>
- Glembin, P., Kerner, M., & Smirnova, I. (Enero de 2013). Cloud point extraction of microalgae cultures. *Separation and Purification Technology*, 103, 21-27.
- Goiris, K., Muylaer, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potencial of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal Phicol*.
- Gómez, A., López, J., Rodriguez, A., Judith, F., Martinez, L., Apolinar, A., & Enríquez, L. (2016). Production of phenolic compounds by four species of

- marine microalgae under different light conditions. *Scielo*. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2016000100014
- Gonzalez, A. (2015). *¿Qué son las microalgas? Interés y uso*. Obtenido de <https://www.cajamar.es/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/investigacion/documentos-y-programas/microalgas-1444391623.pdf>
- Guamán, M., & González, N. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias del Ecuador*. (C. p. bioenergética, Ed.) Obtenido de <http://energia.org.ec/cie/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>
- Gutiérrez, M. C. (2002). La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Boletín Intexter*. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2732/4CROMALIQUEID.pdf>
- Hemalatha, A., Girija, K., Parthiban, C., & Saranya, C. (2013). Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, 151-157. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/257765874_Antioxidant_properties_and_total_phenolic_content_of_a_marine_diatom_Navicula_clavata_and_green_microalgae_Chlorella_marina_and_Dunaliella_salina
- Hielscher. (2019). Sonicación lisis: alteración celular y extracción. *Hielscher*. Obtenido de <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>
- Huang, D., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856.
- INBIOTEC. (2021). Biomasa y refinería. Obtenido de <https://inbiotec-conicet.gob.ar/investigacion/biomasa-biorefineria>
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour Technol*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
- Lee, R. (2008). Phycology. En C. U. Press (Ed.). USA.
- Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- Leong, L., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 69-75.

- Llopiz, A. (2016). *Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la medicina*. Obtenido de <https://www.revistabionatura.com/files/Compuestos-bioactivos-aislados-de-cianobacterias-y-microalgas.pdf>
- Microgreen. (2020). La Espirulina -Alimento Clave En Inmunonutrición- Podría Prevenir Infecciones Virales Como La Gripe Y El Coronavirus. Obtenido de <https://microgreenspirulina.com/espirulina-beneficios-coronavirus/>
- Pedraza Chaverri, J., & Cardenas, N. (2018). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Researchgate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/327412054_Especies_reactivas_de_oxigeno_y_sistemas_antioxidantes_Aspectos_basicos
- Price, G., Badger, R., Woodger, J., & Long, M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism: Functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants,. *Journal of experimental botany*, 1441-1461.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. 635-648.
- Rahimpour, M., Biniaz, P., & Makarem, M. (2017). Integration of microalgae into a existing biofuel industry. . *Bioenergy Systems of the Future* , 418-519.
- Ramírez, J. A. (2018). Actividad antioxidante de las microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Pediastrum* sp. como respuesta a la radiación UV y altitud de origen. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3615/henriquez-ramirez-jorman-alexander.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, A. (2017). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Cuenca. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14825/1/UPS-CT007279.pdf>
- Samaniego, G. (2019). *Repositorio Universidad de las Americas, Quito*. Obtenido de <https://www.udla.edu.ec/2019/04/30/graduada-udla-crea-biofiltros-con-microalgas-para-mejorar-calidad-del-aire-de-quito/>
- Sansone, C., Brunet, C., Noonan, D., & Albin, A. (2020). Antioxidantes de algas marinas como posibles vectores para el control de enfermedades virales. Obtenido de MDPI: <https://mail.google.com/mail/u/0/?pli=1#inbox>
- Sevilla, J. M. (2014). *Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas*. Obtenido de Microalgal Biotechnology Corporation:



<http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>

Urbano, T. (2018). Cultivo de microalgas. Obtenido de <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-microalgas/>

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas. Alemania.

6. ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO (MEDIOS DE CULTIVO)

Anexo 1.1: Solución de trabajo BG-11 (Blue Green-11)

En 496 ml de agua destilada se colocó los componentes del **Anexo 1.1**. Se llevó a volumen final de 500 ml con agua destilada. Se autoclavó y se dejó enfriar a temperatura ambiente para conservarlo en refrigeración.

Tabla 6.1: Componentes del medio BG-11 para Chlorella (Tamariz #6 y Flore #1)

Componente	Adición por 500ml de medio de cultivo
NaNO ₃	0.75 g
K ₂ HPO ₄	0.5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5 ml
Ácido cítrico.H ₂ O	0.5 ml
Citrato amónico férrico	0.5 ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.5 ml
Na ₂ CO ₃	0.5 ml
Traza de metales	0.5 ml

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Anexo 1.2: Solución de trabajo WC

En 496 ml de agua destilada se adicionó los componentes de la **Anexo 2.2**. Se llevó a volumen final de 500 ml con agua destilada, al final del proceso se adicionó 0.5 ml de la solución madre de vitaminas bajo cabina de seguridad. Se autoclavó y se dejó enfriar a temperatura ambiente para conservarlo en refrigeración.

Tabla 6.2: Componentes del medio WC para cianobacterias (Tamariz #11).

Componente	Adición por 500ml de medio de cultivo
NaNO ₃	0.5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 ml
NaHCO ₃	0.5 ml
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0.5 ml
K ₂ HPO ₄	0.5 ml
Traza de metales	0.5 ml

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Anexo 1.3: Solución de trabajo f/2

En 497.5 ml de agua destilada se adicionó los componentes de la **Tabla 2.3**. Se llevó a volumen final de 500 ml con agua destilada, al final del proceso se adicionó 0.5 ml de la solución madre de vitaminas bajo cabina de seguridad. Se autoclavó y se dejó enfriar a temperatura ambiente para conservarlo en refrigeración.

Tabla 6.3: Componentes del medio f/2 para microalga naranja.

Componente	Adición por 500ml de medio de cultivo
NaNO ₃	0.5 ml
NaH ₂ PO ₄	0.5 ml
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0.5 ml
Traza de metales	0.5 ml

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

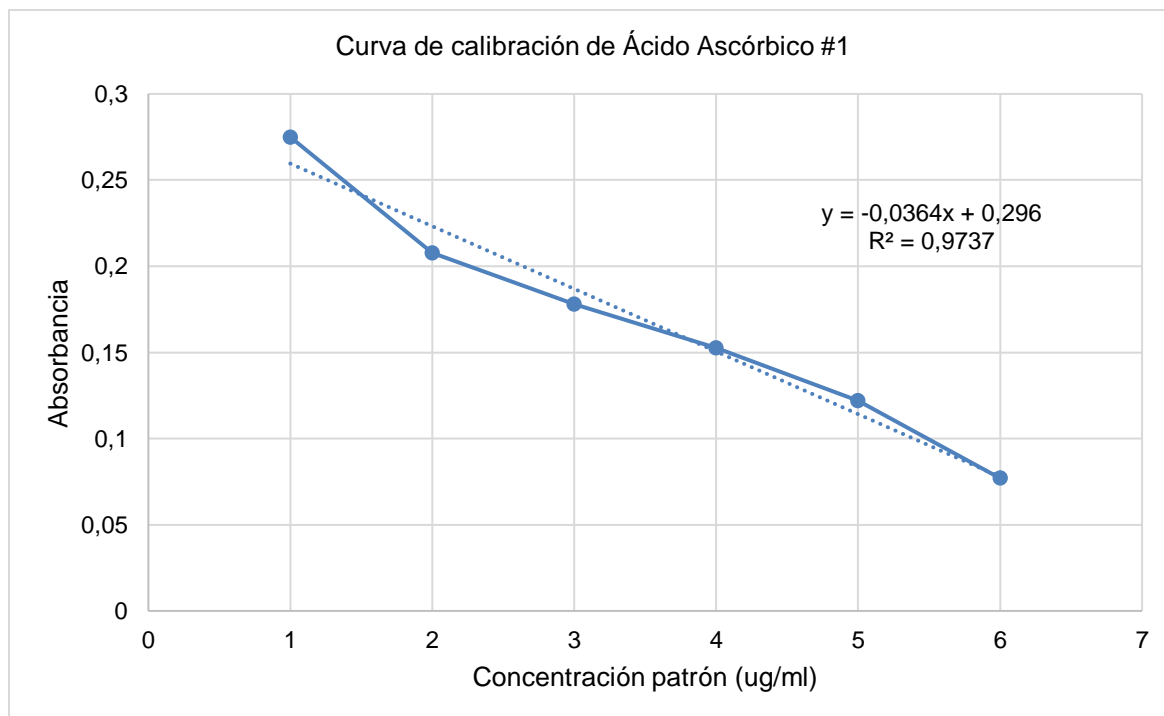
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO POR EL MÉTODO DE DPPH

Tabla 6.4: Curva de calibración #1

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,278	0,216	0,183	0,157	0,126	0,08
Absorbancia 2	0,279	0,209	0,176	0,151	0,119	0,074
Absorbancia 3	0,268	0,208	0,178	0,148	0,122	0,072
Media Abs	0,275	0,211	0,179	0,152	0,122	0,075
Desviación estándar	0,006	0,004	0,004	0,005	0,004	0,004
Coeficiente de variación	2,21	2,07	2,01	3,01	2,87	5,53
AAEAC (mg/g)	175,24	145,44	116,22	99,36	90,33	85,85
Control	0,372					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.1: Curva de calibración #1.



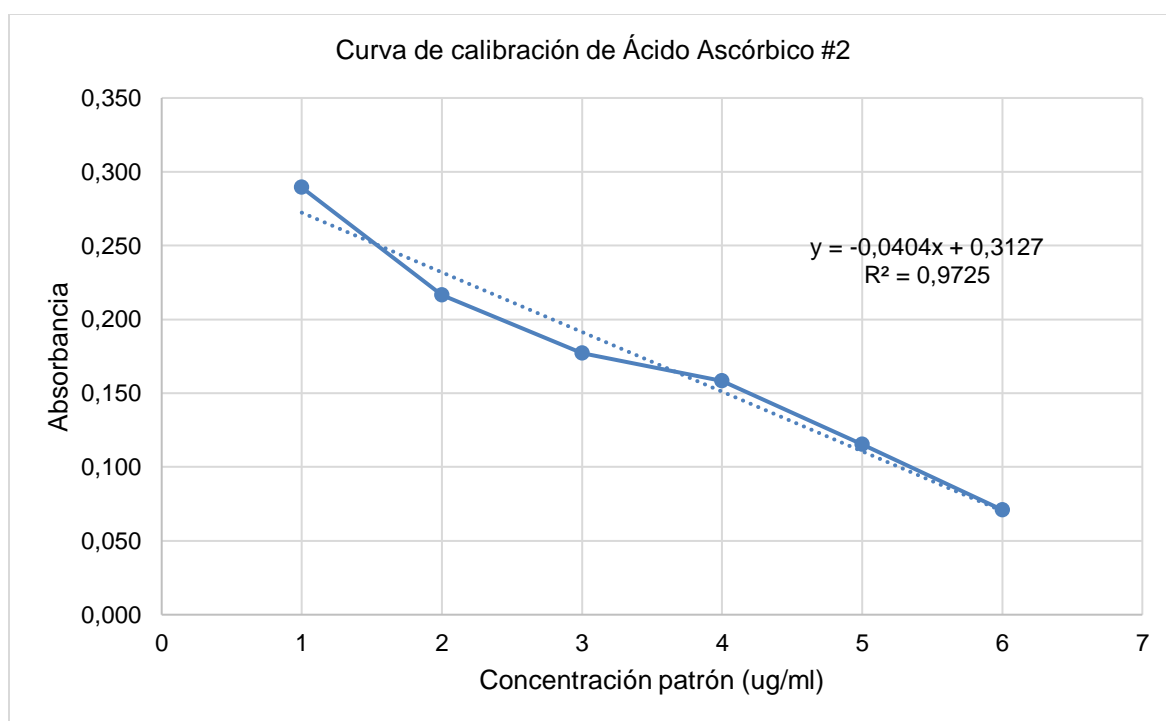
Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 6.5: Curva de calibración #2.

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,291	0,220	0,178	0,160	0,116	0,07
Absorbancia 2	0,287	0,220	0,180	0,155	0,110	0,072
Absorbancia 3	0,29	0,210	0,173	0,160	0,120	0,071
Media Abs	0,289	0,217	0,177	0,158	0,115	0,071
Desviación estándar	0,002	0,006	0,004	0,003	0,005	0,001
Coefficiente de variación	0,72	2,66	2,04	1,82	4,36	1,41
AAEAC (mg/g)	136,96	128,16	107,25	88,15	84,71	79,47
Control	0,372					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.2: Curva de calibración #2.



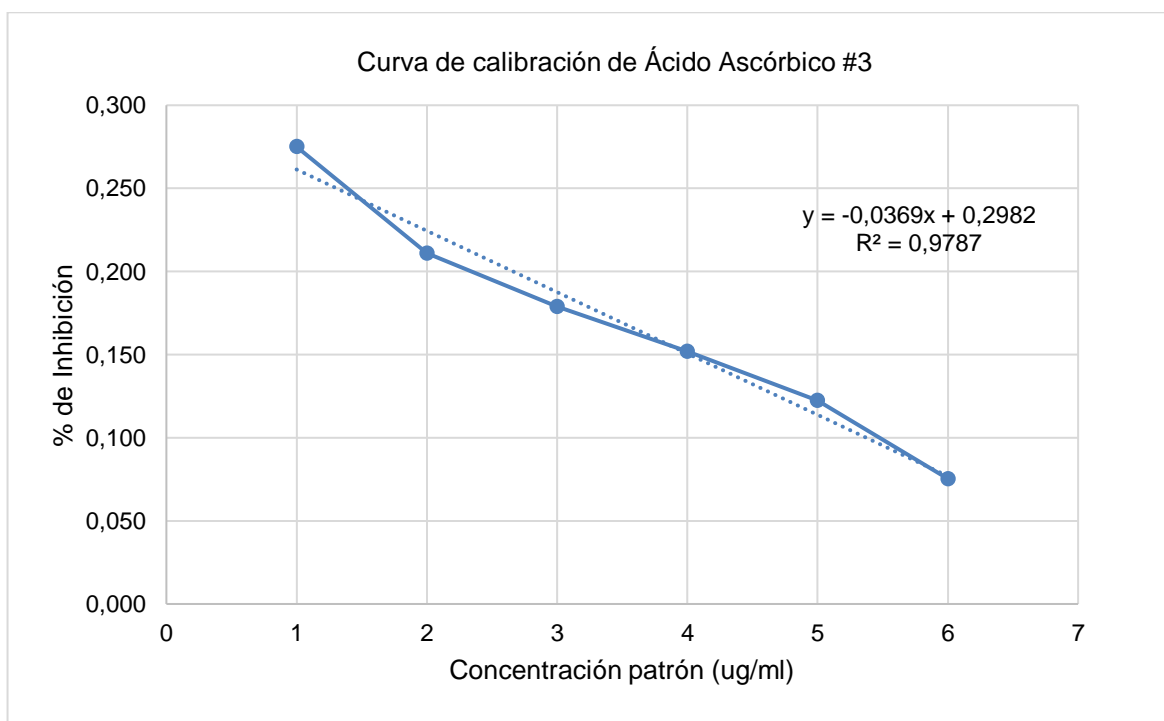
Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 6.6: Curva de calibración #3.

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,275	0,219	0,172	0,145	0,109	0,07
Absorbancia 2	0,269	0,210	0,165	0,152	0,110	0,062
Absorbancia 3	0,277	0,213	0,166	0,144	0,111	0,066
Media Abs	0,274	0,214	0,168	0,147	0,110	0,066
Desviación estándar	0,004	0,005	0,004	0,004	0,001	0,004
Coefficiente de variación	1,52	2,14	2,26	2,97	0,91	6,06
AAEAC (mg/g)	155,98	131,89	115,82	96,21	90,33	84,99
Control	0,360					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.3: Curva de calibración #3.



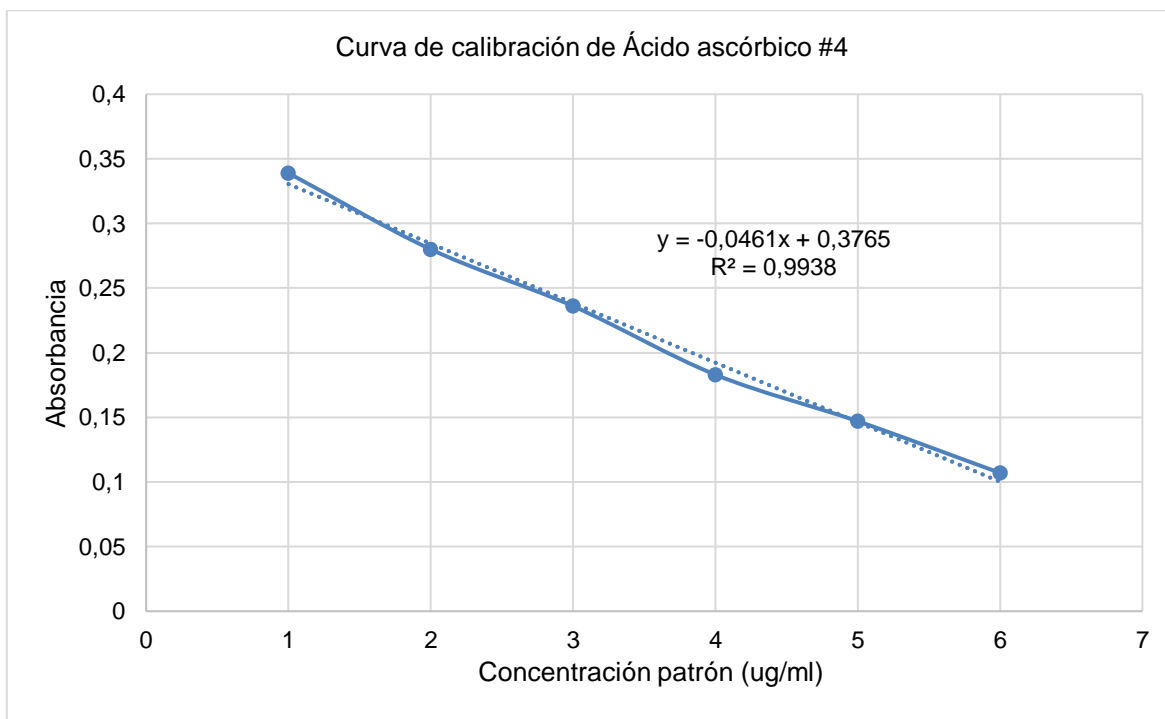
Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 6.7: Curva de calibración #4

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,322	0,272	0,235	0,175	0,149	0,094
Absorbancia 2	0,340	0,284	0,244	0,175	0,145	0,116
Absorbancia 3	0,339	0,285	0,248	0,198	0,147	0,111
Media Abs	0,334	0,280	0,242	0,183	0,147	0,107
Desviación estándar	0,007	0,005	0,005	0,010	0,002	0,009
Coeficiente de variación	2.5	2.10	6.20	5.90	1.10	8.8
AAEAC (mg/g)	155,98	131,89	115,82	96,21	90,33	84,99
Control	0,366					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.4: Curva de calibración #4.



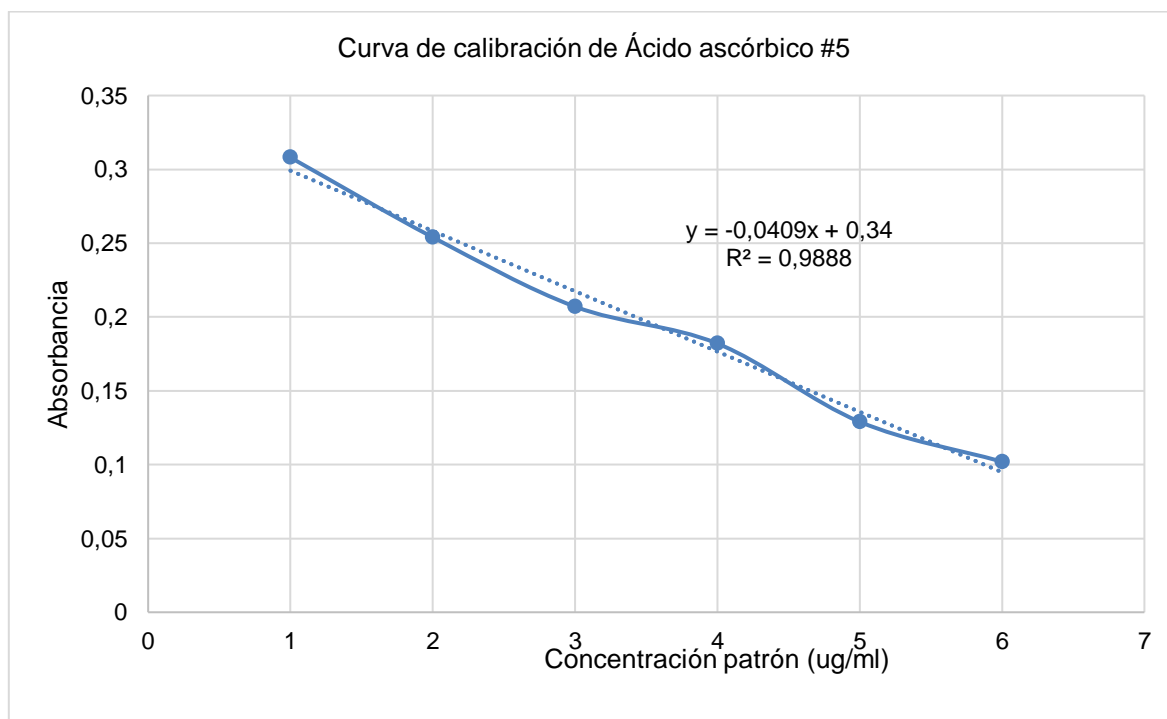
Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 6.8: Curva de calibración #5.

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,301	0,260	0,208	0,186	0,129	0,099
Absorbancia 2	0,309	0,254	0,202	0,172	0,126	0,106
Absorbancia 3	0,314	0,249	0,211	0,189	0,132	0,101
Media Abs	0,308	0,254	0,207	0,182	0,129	0,102
Desviación estándar	0,005	0,004	0,004	0,007	0,002	0,003
Coeficiente de variación	1.70	1.80	1.80	4.10	1.80	2.8
AAEAC (mg/g)	155,98	131,89	115,82	96,21	90,33	84,99
Control	0,366					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.5: Curva de calibración #5.

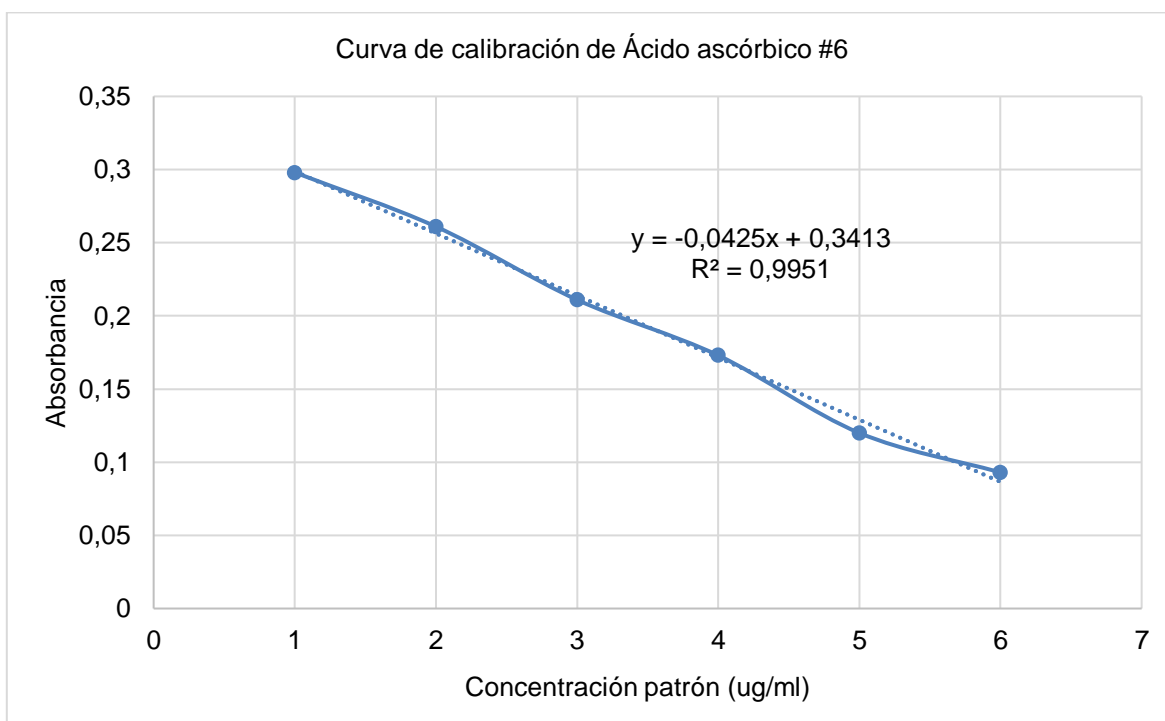


Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Tabla 6.9: Curva de calibración #6.

CONCENTRACIÓN PATRONES (ug/mL)	1	2	3	4	5	6
Absorbancia 1	0,299	0,259	0,210	0,169	0,122	0,089
Absorbancia 2	0,295	0,261	0,209	0,172	0,120	0,091
Absorbancia 3	0,301	0,263	0,213	0,177	0,118	0,099
Media Abs	0,298	0,261	0,211	0,173	0,120	0,093
Desviación estándar	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,004
Coeficiente de variación	0.80	0.60	0.80	1.90	1.40	4.26
AAEAC (mg/g)	155,98	131,89	115,82	96,21	90,33	84,99
Control	0,366					

Fuente y elaboración: Autor, 2021.

Figura 6.6: Curva de calibración #6.


Fuente y elaboración: Autor, 2021.